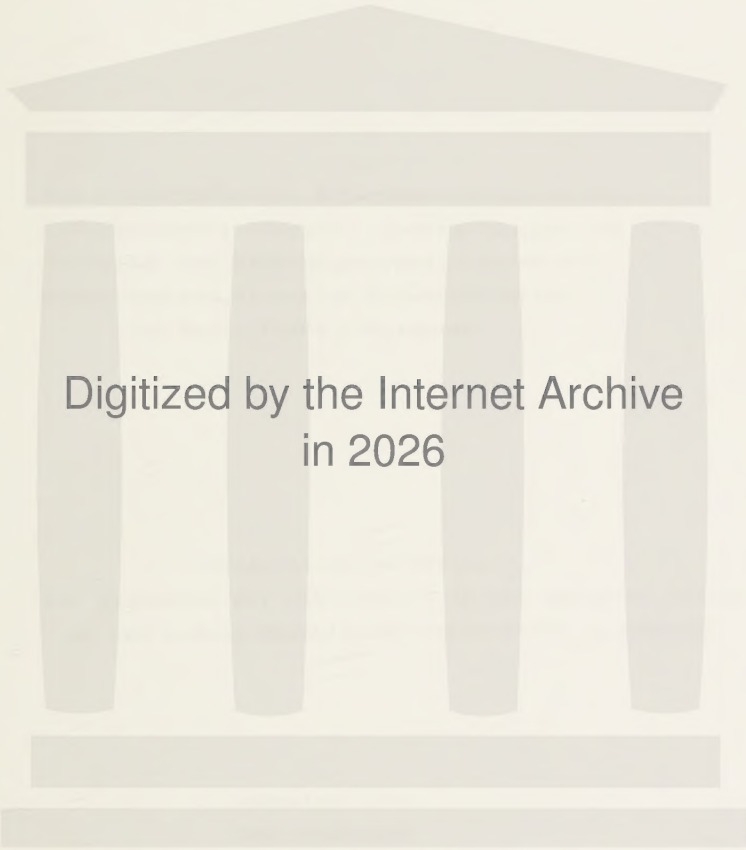


Zur histochemischen Altersbestimmung
gedeckter Hirnrindenverletzungen -
Untersuchungen zum Verhalten der
NADP-Diaphorase, Glycero-3-P-
Dehydrogenase, Glucose-6-P-
Dehydrogenase und
Naphtylacetat-Esterase

Paul Oblinger

*Diss.
München
1905*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0086

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Spann

Zur histochemischen Altersbestimmung gedeckter
Hirnrindenverletzungen - Untersuchungen zum
Verhalten der NADP-Diaphorase, Glycero-3-P-
Dehydrogenase, Glucose-6-P-Dehydrogenase
und Naphtylacetat-Esterase

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Paul Oblinger
aus
Dillingen/Donau
1985

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Eisenmenger

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.4.1985

Gewidmet meinen lieben Eltern,
Ludwig und Maria Theresia Oblinger!

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
1. Problemstellung	1
1.0.1. Auswahl der Enzyme	1
1.0.2. Juristische und rechtsmedizinische Aspekte	2
1.0.3. Zielsetzung	2
1.1. Rechtsmedizinische Bedeutung der Alters- bestimmung von Hirnverletzungen	2
1.1.1. Vitalität von Verletzungen, speziell Hirnverlet- zungen und routinehistologische Methoden	3
1.2. Pathomechanik und Pathomorphologie von Rindenprellungsherden	5
1.3. Histologische Beurteilungskriterien (Stadien I-III) und bisherige Ergebnisse	5
1.4. Histochemische Beurteilungskriterien mit bisherigen Ergebnissen	8
B. MATERIAL und METHODE	
2. Allgemeines zur Enzymhistochemie	10
2.1.1. Forderungen an die Methodik	10
2.1.2. Reaktionsprinzipien	11
2.2. Nachweis und Stellung der Enzyme im Stoffwechsel	12
2.2.1. NADP-Diaphorase	12
2.2.2. Glucose-6-Ph-DH	15
2.2.3. Glycero-3-Ph-DH	15
2.2.4. Naphtylacetat-Esterase	16
2.3. Material	18
2.3.1. Gewebsentnahme- und Verarbeitungskriterien	18
2.3.2. Häufigkeitsverteilung nach Überlebenszeit	19
2.3.3. Einfluß der postmortalen Liegedauer	21
2.3.4. Einfrieren	23
2.3.5. Schneiden	24

C.	ERGEBNISSE und BEFUNDE	Seite
3.1.0.	NADP-Diaphorase-Normalbefund.....	26
3.1.0.1.	Befunde nach hypoxämischer Schädigung.....	26
3.1.0.2.	Bisherige Befunde nach Ischämie.....	26
3.1.0.3.	Akute Ischämie und chronische Hypoxämie.....	27
3.1.0.4.	Nach mechanischer Schädigung.....	28
3.1.0.5.	Nach thermischer Schädigung.....	29
3.1.1.	Eigene Befunde - Einteilung in Gruppen.....	29
3.1.1.1.	Gruppe 1: sofortiger Tod.....	29
3.1.1.2.	Gruppe 2: - 1 h Überlebenszeit.....	31
3.1.1.3.	Gruppe 3: 1 - 2 h	31
3.1.1.4.	Gruppe 4: 2 - 4 h	31
3.1.1.5.	Gruppe 5: 4 - 6 h	31
3.1.1.6.	Gruppe 6: 6 - 13 h	31
3.1.1.7.	Gruppe 7: 13 - 24 h	33
3.1.1.8.	Gruppe 8: 1 - 2 d	34
3.1.1.9.	Gruppe 9: 2 - 4 d	35
3.1.2.1.	Gruppe 10: 4 - 6 d	35
3.1.2.2.	Gruppe 11: 6 - 15 d.....	36
3.1.2.3.	Gruppe 12: über 15 d Überlebenszeit.....	38
3.2.0.	Glucose-6-Ph-Dehydrogenase-Normalbefund.....	39
3.2.1.	Bisherige Befunde nach chronischer hypoxämischer Schädigung und nach akuter Ischämie...	39
3.2.2.	Nach mechanischer Schädigung	40
3.2.3.	Nach thermischer Schädigung	41
3.2.4.	Eigene Ergebnisse	41

	Seite
3.3.0. Glycero-3-Ph-Dehydrogenase-Normalbefund.....	42
3.3.0.1. Nach akuter und chronischer Ischämie (Hypoxämie).....	42
3.3.0.2. Nach thermischer Schädigung	43
3.3.1. Eigene Befunde	43
3.3.1.1. Gruppe 1: sofortiger Tod	43
3.3.1.2. Gruppe 2: - 1 h Überlebenszeit	44
3.3.1.3. Gruppe 3: 1 - 2 h	44
3.3.1.4. Gruppe 4: 2 - 4 h	45
3.3.1.5. Gruppe 5: 4 - 6 h	45
3.3.1.6. Gruppe 6: 6 - 13 h	45
3.3.1.7. Gruppe 7: 13 - 24 h	45
3.3.1.8. Gruppe 8: 1 - 2 d	45
3.3.1.9. Gruppe 9: 2 - 4 d	46
3.3.2.1. Gruppe 10: 4 - 6 d	46
3.3.2.2. Gruppe 11: 6 - 15 d	46
3.3.2.3. Gruppe 12: über 15 d Überlebenszeit.....	46
3.4.0. Naphtylacetat-Esterase-Normalbefund	46
3.4.0.1. Bisherige Befunde unter pathologischen Bedingungen	46
3.4.1. Eigene Befunde	47
3.4.1.1. Gruppe 1: sofortiger Tod	47
3.4.1.2. Gruppe 2: - 1 h Überlebenszeit	48
3.4.1.3. Gruppe 3: 1 - 2 h	48
3.4.1.4. Gruppe 4: 2 - 4 h	48
3.4.1.5. Gruppe 5: 4 - 6 h	48
3.4.1.6. Gruppe 6: 6 - 13 h	50
3.4.1.7. Gruppe 7: 13 - 24 h	50
3.4.1.8. Gruppe 8: 1 - 2 d	52
3.4.1.9. Gruppe 9: 2 - 4 d	52
3.4.2.1. Gruppe 10: 4 - 6 d	52
3.4.2.2. Gruppe 11: 6 - 15 d	52
3.4.2.3. Gruppe 12: über 15 d Überlebenszeit	52

D. ZUSAMMENFASSUNG und DISKUSSION

	Seite
4. Zusammenfassung der Ergebnisse - Zeitliche Grenzwertkriterien	54
4.1. Veränderungen bei Darstellung der NADP-Diaphorase - Zusammenfassung	55
4.2. Veränderungen bei Darstellung der Glucose-6-Ph-DH - Zusammenfassung	56
4.3. Veränderungen bei Darstellung der Glycero-3-Ph-DH - Zusammenfassung	57
4.4. Veränderungen bei Darstellung der Naphtyl-Acetat-Esterase - Zusammenfassung	58
4.5. Vergleich und Abschätzung der Möglichkeiten der histochemischen Darstellung obiger Enzyme mit histologischen Methoden in Abhängigkeit von der postmortalen Liegedauer	59
4.6. Zusammenfassung	60

Anhang: Tabellen

Literaturverzeichnis

A. EINLEITUNG

1. Anknüpfend an frühere Untersuchungen des zeitabhängigen Verhaltens von sechs Enzymen (SDH, NADD, LDH, unspezifische Esterase, saure und alkalische Phosphatase) bei gedeckten Hirnrindenverletzungen durch EISENMENGER, GILG et al. (7,8,12) sollte das Verhalten weiterer vier Enzyme histochemisch untersucht werden.

Von EISENMENGER, GILG et al. (7,8,12) wurde ausgeführt, daß sich mit Hilfe der Enzymhistochemie durchaus weitere Kriterien zur Altersbestimmung von Hirnverletzungen finden lassen; wegen der Schwierigkeit der sicheren Abgrenzung der überwiegend quantitativen Veränderungen sollte die Enzymhistochemie jedoch nur als Ergänzung zu den überwiegend qualitativen routinehistologischen Befunden angewandt werden. Mit der Untersuchung von vier weiteren Enzymen sollte nun geprüft werden, ob sich für die enzymhistochemischen Verfahren weitere Gesichtspunkte quantitativer oder qualitativer Art ergeben.

1.0.1. Ausgewählt wurden zur Ergänzung der oben genannten Untersuchungen folgende vier Enzyme:

Als erstes bot sich wegen seiner biochemischen "Verwandtschaft" mit der bereits untersuchten NAD-Diaphorase das Coenzym NADP-Diaphorase an.

Da das biochemische Verhaltensmuster der mitochondrialen, an Nervenzellen besonders hohe Aktivitäten zeigenden, Alpha-Glycerophosphat-DH der gleichfalls coenzymunabhängigen und intramitochondrial gelegenen SDH ähnelt (LOJDA(25)), war auch hier ein Vergleich von Interesse.

Zum Vergleich mit der bereits untersuchten unspezifischen Esterase wurde die 1-Naphtylacetat-Esterase ausgewählt. Schließlich wurde noch wegen seiner Ähnlichkeit zur ebenfalls bereits von EISENMENGER, GILG et al. (7,8) untersuchten LDH die ebenso coenzymabhängige Glucose-6-P-DH gewählt.

1.0.2. Die zeitliche Zuordnung von Schädel-Hirn-Traumen spielt in der Kriminalistik, Strafgerichtsbarkeit sowie im Versicherungsrecht eine wichtige Rolle. Dabei sollte den juristischen Beweisanforderungen vor allem bezüglich der Sicherheit der Aussage Rechnung getragen werden; zugleich sollte aber auch einer routinemäßigen Durchführbarkeit ohne großen apparativen Aufwand in der Rechtsmedizin ein hoher Stellenwert eingeräumt werden, was beispielsweise für histologische Routinefärbungen am ZNS zutrifft (NISSL-, HE-Färbungen und andere). Der enzymhistochemischen Altersbestimmung von Hirnverletzungen mit zeitlichen Grenzwertbefunden wurden in den letzten Jahren einige umfangreiche Untersuchungen gewidmet, so z.B. von EISENMENGER, GILG et al. (7,8). Die Praktikabilität enzymhistochemischer Färbemethoden sollte nun an vier weiteren Enzymen unter Beweis gestellt werden.

1.0.3. Zielsetzung dieser Arbeit sollte sein, durch enzymhistochemische Untersuchungen von vier weiteren Enzymen zusätzliche Kriterien zur Altersbestimmung von Hirnverletzungen finden zu können.

Die Aktivitätsveränderungen dieser weiteren Enzyme wurden nach denselben Grundprinzipien bezüglich der Einteilung in Gruppen nach Überlebenszeiten und bezüglich der Kriterien zur Beurteilung der Vitalität und des Wundalters der Rindenprellungsherde untersucht. Hierdurch sollte die praktische Anwendbarkeit der Enzymhistochemie zur postmortalen Altersbestimmung von Rindenprellungsherden eine erweiterte Überprüfung erfahren.

1.1. Die Altersbestimmung von Hirnverletzungen ist von großer rechtsmedizinischer Bedeutung, da sie zur Klärung von Fragen unterschiedlicher Rechtsgebiete (Straf-, Zivil-, Sozial-, Versicherungsrecht) einen wesentlichen Beitrag leisten kann. Erfolgen z.B. mehrere Schädel-Hirntraumata zeitlich nacheinander und treten bei einem dieser Traumen sekundäre Schädigungen auf, wie z.B. eine Epilepsie oder

eine Spätapoplexie, dann kann die Frage, welches dieser Traumata den bleibenden Schaden gesetzt hat, eine zentrale rechtsmedizinische und juristische Bedeutung erlangen. Allgemein ist festzustellen, daß infolge der steigenden Motorisierung im Straßenverkehr und relativ hoher Beteiligung von Schädel-Hirntraumen bei Verkehrsunfällen mit Personenschaden die Schädel-Hirnverletzungen in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen haben.

Neuere computertomographische Untersuchungen von LANKSCH et al.(22) 1977 deckten bei 519 Schädel-Hirntraumen 42 (= 7,1%) akute subdurale Blutungen auf. Wirklich zuverlässige einheitliche Zahlenhäufigkeiten der Blutungen bei Schädel-Hirnverletzungen sind nach PRATZKE und KRAULAND(3) schwer zu erhalten. Die Schwierigkeit besteht diesen Autoren zufolge darin, daß auf der einen Seite die Befunde lediglich registriert werden ohne Rücksicht auf die Bedeutung für den tödlichen Ausgang, auf der anderen Seite die Zahlen zu klein sind, um brauchbare Vergleiche zuzulassen. Das verschiedene Ausgangsmaterial und die Änderungen der äußeren Verhältnisse(z.B. durch Zunahme der Verkehrsunfälle) sind zu berücksichtigen und auch ein- und derselbe Untersucher dürfte über einen längeren Zeitraum den Befunden nicht immer die gleiche Aufmerksamkeit schenken können.

So waren von KRAULAND(19/Berlin) im Zeitraum 1956-59 bei 282 untersuchten Schädel-Hirntraumen zu 53% Rindenprellungsherde entweder als Haupt- oder Nebenfund gefunden worden, von SCHLEYER und KERSTIN(Bonn) 1963 bei 223 Fällen 50% Kontusionen entdeckt worden. FREYTAG(Baltimore) fand dagegen bei einem größeren Kollektiv von 1367 Traumen im Zeitraum 1951-60 in 63% der Fälle Rindenprellungsherde(KRAULAND,19).

1.1.1. Vitale Gewebsreaktionen wurden bis in die dreißiger Jahre dieses Jahrhunderts überwiegend makroskopisch beurteilt. Erste mikroskopische feingewebliche Untersuchungen zur Beurteilung vitaler Reaktionen und zur Altersbestimmung von Wunden wurden von WALCHER(60) durchgeführt.

Die Forschungen auf dem Gebiet der Wundheilung und damit direkt oder indirekt auf dem Gebiet der Wundaltersbestimmung wurden fortan von einer Reihe von Wissenschaftlern vorangetrieben, wie z.B. von RUSSEL, ALLGÖWER, ZOLLINGER, PROKOP und auch RAEKALLIO(62,37-42).

Die Routinehistologie umfaßt in der Rechtsmedizin im Wesentlichen die Färbung von formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Dünnschnitten. Hauptparameter lokaler vitaler Reaktionen bei mechanisch verursachten Hautwunden stellen Entzündung und Nekrose dar. Die Leukozytose ist dabei das mit der üblichen Histologie am frühesten erfaßbare Kennzeichen einer vitalen Gewebsreaktion. Zeitlich gesehen tritt die Leukozytose frühestens 4 Stunden posttraumatisch auf, ein Nachteil der Routinehistologie gegenüber der Enzymhistochemie, mit welcher Veränderungen meist bereits früher erfaßbar sind.

Bei Rindenprellungsherden gedeckter Schädel-Hirntraumen liegt im Gegensatz zur Wundheilung verletzter Haut ein differierendes Wundheilungsmuster vor; zum einen auf Grund unterschiedlichen Gewebeaufbaus, zum zweiten wegen der in der Regel bestehenden Asepsis gedeckter Hirntraumen. Nach KRAULAND(19) kommt bei der Wundheilung von Schädel-Hirntraumen dem Mesenchym und der Glia die wesentliche Bedeutung zu, womit er KREUTZBERG(20,21) und andere bestätigte. Bei der Reparation und Organisation fehlt eine Einwanderung von Leukozyten.

Als Routinefärbung zur Darstellung von Nerven- und Gliazellen hat sich allgemein die Kresylechtviolett-Färbung bewährt, wohingegen Färbungen nach GOLDNER das Bindegewebe und evtl. ödematöse Veränderungen besser hervorzuheben vermögen. Diese Färbemethoden wurden im experimentellen Teil zu Vergleichszwecken angefertigt.

1.2.0. Bei PETERS(33-35) und SPATZ(50-52) werden die unterschiedlichen Theorien einiger Autoren bezüglich des Entstehungsmechanismus der Kontusionen gedeckter Hirntraumen gründlich erörtert, weshalb hier auf deren Diskussion verzichtet wird. Von großer Bedeutung für eine exakte Wundaltersbestimmung ist jedoch die Unterscheidung zwischen primär mechanischen und sekundären Schädigungen, bedingt z.B. durch Hirnödem.

Eine primäre mechanische Schädigung des Hirngewebes kann einerseits in einer direkten Schädigung von Nervenzellen bestehen (beispielsweise Axonabrisse) oder indirekt durch Ruptur von Blutgefäßen (Kapillaren etc.) bewirkt werden.

Im Gefolge der auftretenden Blutung in das Hirngewebe kann die Umstellung auf anaerobe Glykolyse zu einem circulus vitiosus führen. Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte mit lokaler Azidose, Aktivierung zellständiger proteolytischer Enzyme sowie der später erfolgende Einstrom von Gewebsflüssigkeit aus dem umgebenden Gewebe bewirken eine lokale Ödembildung und damit eine weitere Perfusionsverminderung.

Davon ist die sekundäre Schädigung streng zu unterscheiden: Posttraumatisch entstandene Stoffwechselstörungen, Hirndruck oder Hirnödem verschlechtern die Gewebsperfusion und führen damit zur sekundären hypoxämischen Schädigung der besonders auf O_2 - Mangel empfindlich reagierenden Nerven- und Endothelzellen. So geschädigte Gefäßendothelzellen können die Ausbildung sekundärer Druckblutungen zur Folge haben, die nicht mit den zeitlich früher auftretenden primären Kontusionsblutungen verwechselt werden dürfen.

1.3.0. Der Erforschung einer zeitlichen Abfolge von Veränderungen bei Hirnverletzungen sind bereits eine solche Fülle von Arbeiten gewidmet worden, daß hier nur exemplarisch Autoren bezüglich ihrer bisherigen Ergebnisse genannt werden können:

SPATZ(50,51,52) als früher Wegbereiter auf dem Forschungsgebiet der "Morphologischen Veränderungen der Rindenprellungsherde" und PETERS(33-35) teilten den Gesamtablauf der Veränderungen in drei zeitlich abgrenzbare Stadien:

Das Stadium I umfaßt die Veränderungen bei Blutung und Nekrose bis nach ca. ein bis zwei Tagen.

PETERS zufolge ist der frische Rindenprellungsherd vor Manifestation einer Nekrose an den petechialen Blutungen, Rhexisblutungen, erkennbar. Diese Blutungen treten unmittelbar nach der Gewalteinwirkung auf, so wie die oft über den Herden nachzuweisenden Subarachnoidalblutungen.

Nach SPATZ(50-52) werden die Rindenprellungsherde nur in den an der Oberfläche liegenden Windungen gefunden. Von "isoliertem Tal" spricht man ihm zufolge, wenn sich zwei Rindenprellungsherde nebeneinander an benachbarten Windungskuppen befinden bei dazwischen erhaltenem Windungstal.

Das Stadium II umfaßt die Vorgänge der Resorption und Organisation nach etwa 4 - 30 Tagen, charakterisiert durch Gefäßbindegewebswucherungen am Nekroserand(Randwallbildung). Zellen des Gefäßendothels und der Glia bilden sich zu Fettkörnchenzellen um, die sich zwischen den Gefäßwucherungen manifestieren. Ein Auftauchen der Fettkörnchenzellen bezeichneten KIENE und KÜLZ(16) erst nach 15 Tagen. Dagegen fanden unabhängig voneinander KRAULAND(19) sowie EISENMENGER et al.(7,8) ein erstes Auftreten der Fettkörnchenzellen nach 3 Tagen und - ebenso nahezu deckungsgleich - ein erstes Auftreten von Hämosiderin(intrazellulär,grobkörnig) etwa ab dem 4. postmortalen Tag.

Das Blutabbaupigment Hämatoidin, der postmortal entstehende Teil des Hämoglobins, war ab dem 13. Tag postmortal regelmäßig vorhanden.

Der Übergang vom zweiten Stadium zum Stadium III ist durch den Untergang der Körnchenzellen gegeben, wodurch die Maschen des bindegewebigen Netzwerkes größer werden und am Ende dieses Vorganges bindegewebige Stränge mit Faserglia

verbleiben. Die Defektheilung wird dann häufig von einer verdickten Arachnoidea überzogen.

Die Demarkierung einer vollständigen Nekrose besitzt Mulden- oder Keilform, wobei die Nekrosebasis zur Hirnoberfläche zeigt und die Keilspitze der Nekrose oft bis ins Marklager reicht.

Wegen der Dynamik der Veränderungen ist insbesondere das Stadium I und das frühe 2. Stadium für die posttraumatische Wundaltersbestimmung wichtig. Die frühesten Reaktionen auf ein Trauma sind an den sehr vulnerablen Nervenzellen zu beobachten. Vielfältige Manifestationsmuster mit teilweise zeitlichen Überschneidungen ließen bei den verschiedenen Autoren keine eindeutige einheitliche Aussage in der zeitlichen Abfolge zu. Die uneinheitlichen Beobachtungen in der Literatur, z.B. in Bezug auf Zellschrumpfung, Nervenzellschwellung mit geblähten Kernen, Vakuolenbildung, Kernmembranabblassungen, korkenzieherartigen Wellungen der Zellfortsätze, Kompressionsformen und bezüglich des Auftretens von Formalinpigment etc., wurden von EISENMENGER, GILG et al. (7,8) ausführlich beschrieben. In diesem Zusammenhang sei nur auf einige der dort diskutierten Autoren verwiesen:

PETERS(33-35), COURVILLE und RAND(45), SCHACHT und MINAUF(47) GREENFIELD(14) und ZOLLINGER(62).

"Theoretisch experimentelle und statistische Grundlagen zur zytomorphologischen Altersbestimmung traumatischer Rindenblutungen" wurden 1980 von OEHMICHEN M., EISENMENGER W. und RAFF G. (28) veröffentlicht. Die Korrelation zytopathologischer Einzelkriterien in Rindenprellungsherden mit dem posttraumatischen Intervall erlaubte unter Berücksichtigung des jeweils zur Verfügung stehenden Fallmaterials folgende Schlüsse:

1. Für jedes Einzelkriterium kann eine Abhängigkeit des ersten und letzten Auftretens (Beobachtungszeitraum)

vom posttraumatischen Intervall erfaßt werden.

2. Berechnet werden kann die relative Häufigkeit von Beobachtungen eines Kriteriums während des Beobachtungszeitraumes.
3. Aufgrund dieser Daten kann die Vertrauensgrenze für die relative Häufigkeit geschätzt werden, in der mit einer 95%igen statistischen Wahrscheinlichkeit ein Kriterium während des Beobachtungszeitraumes zu erwarten ist.
4. Ferner kann die verteilungsfreie Toleranzgrenze mit einer 95%igen statistischen Wahrscheinlichkeit berechnet werden.

1.4. Enzymhistochemische Methoden zur Abklärung vitaler Reaktionen und zur Wundaltersbestimmung führte als erster RAEKALLIO(38) 1961 in der Rechtsmedizin ein. Sein Grundgedanke war, daß den mikroskopisch-morphologisch faßbaren Veränderungen funktionelle Veränderungen im Gewebs- und Zellstoffwechsel vorausgehen und daß diese mittels enzymhistochemischer Verfahren sichtbar gemacht werden könnten. Früheste enzymhistochemische Befunde wurden von RAEKALLIO (37-39) etwa 1 Stunde nach einer Hautläsion beobachtet, wobei er im unmittelbaren Wundbereich einen Rückgang der Fermentaktivität(negative vitale Reaktion), in der Wundperipherie dagegen eine Zunahme der Enzymaktivität(positive vitale Reaktion) erkannte.

Eine solche Enzymaktivitätszunahme stellte RAEKALLIO schon nach einstündiger Überlebenszeit bei der Esterase und ATPase, nach 2 Stunden bei der Aminopeptidase fest. 1970 veröffentlichte er eine erste Arbeit über den Serotoningehalt des Wundgewebes als Ausdruck einer vitalen Reaktion (42,43). Über den bloßen Nachweis vitaler Reaktionen hinausgehend war RAEKALLIO(42,43) zufolge eine nähere Aussagefähigkeit über das Wundalter durch kombinierte Serotonin- und Histamingehaltsbestimmungen zu erreichen:

Während der Histamingehalt des Wundgewebes bei Überlebens-

zeiten von weniger als fünf Minuten und mehr als 24 Std. meist vermindert, in der übrigen Zeit aber signifikant erhöht war, lag der Serotoningehalt im Wundgewebe dagegen praktisch immer deutlich über dem der Vergleichshaut.

RAEKALLIO verwies darauf, daß ähnliche Untersuchungen - wie sie auch FIOCH(36) modifiziert bei thermischen Hautschäden durchführte - nicht allein für Hautwunden, sondern ebenso für andere Gewebe wünschenswert seien.

Am Rattenhirn registrierte COLMANT(6) 1961 die Frühveränderungen an artifiziell sauerstoffmangelgeschädigten Nervenzellen. Die als Vergleichsparameter dienlichen Befunde von COLMANT(6) werden ebenso wie jene von KREUTZBERG und PETERS(20) ("enzymhistochemische Beobachtungen beim experimentellen Hirntrauma der Ratte") später noch genauer dargestellt.

Darauf aufbauend wurden dann, wie schon oben angeführt, Untersuchungen speziell zur enzymhistochemischen Altersbestimmung von Hirnverletzungen mit zeitlichen Grenzwertbestimmungen von EISENMENGER, GILG et al.(7,8,12) durchgeführt. Dabei ergab sich, daß bei zeitlichen Grenzwertbestimmungen in der mikroskopischen Beurteilung qualitative Veränderungsmerkmale mit ungleich größerer Sicherheit zu verwerten sind, da quantitative Veränderungen z.B. im Sinne von Farbnuancen zu sehr subjektiver Beurteilung mit mangelnder Vergleichsmöglichkeit unterliegen. Im Anschluß daran sollte nun - ergänzend zu den sechs bereits untersuchten Enzymen - festgestellt werden, ob sich aus dem Verhalten von vier weiteren Enzymen neue und weiterführende Gesichtspunkte und Anknüpfungsmomente - möglicherweise im Sinne von qualitativen Veränderungen - ergeben.

Hierzu wurden nach Literaturstudium und nach dem Kriterium der Vergleichbarkeit mit bereits untersuchten Enzymen folgende vier Enzyme ausgewählt:

NADP-Diaphorase, Glycero-3-Ph-DH, Glucose-6-Ph-DH und Naphtylacetat-Esterase.

B. MATERIAL und METHODE

2.1. Enzyme beschleunigen als Biokatalysatoren die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion, ohne die Lage des Reaktionsgleichgewichtes zu beeinflussen. Sie kommen ubiquitär in allen pflanzlichen und tierischen Organismen vor und können biochemisch quantitativ und qualitativ nachgewiesen werden. Bei den biochemischen Untersuchungsmethoden wird jedoch keine intrazelluläre Lokalisation der Enzyme erreicht. Dies gelang erst mit Hilfe der Enzymhistochemie, deren lebhafter Aufschwung mit einer Veröffentlichung LISON's(24) 1936 seinen Anfang nahm. Die moderne Enzymhistochemie geht auf die Entwicklung eines Nachweises für die alkalische Phosphatase am histologischen Schnitt von GOMORI(19;1939) und TAKAMATSU(55;1939) zurück. Die Enzymhistochemie wurde inzwischen an vielen Instituten zur Routinemethode. Trotzdem bedarf die Beurteilung der Aussagekräftigkeit enzymhistochemischer Methoden einer überaus großen Einarbeitung und Erfahrung.

2.1.1. In der Enzymhistochemie ist es wesentlich, das Enzym und das bei der Substratumsetzung anfallende Reaktionsprodukt am Lokalisationsort(intramitochondrial, endoplasmatisch-retikulär) zu erhalten, die Zell- und Gewebsstruktur zu bewahren und das Endprodukt der Reaktion mikroskopisch sichtbar zu machen.

Folgende Forderungen sind daher bei allen enzymhistochemischen Untersuchungsmethoden zu beachten(LOJDA et al.(26)):

1. Gewebe- und Schnittvorbehandlung sollen die Verteilung und Aktivität des Enzyms möglichst unbeeinflusst lassen.
2. Substrat und Hilfsreagentien sollen gleich schnell in alle Zellen und ihre Bestandteile eindringen.
3. Es soll möglichst große Substratspezifität des Enzyms vorliegen.
4. Hilfsreagentien sollen die Enzymreaktion und das Eindringen des Substrats nicht behindern.

5. Das Produkt der Enzymreaktion soll sich schnell mit dem Hilfsreagens verbinden, möglichst unabhängig vom Zellmilieu.
6. Sofortige Ausfällung des Endprodukts, Unlöslichkeit in Wasser und Lipiden, es soll auch amorph oder zumindest mikrokristallin sein.
7. Die an der Reaktion beteiligten Substanzen sollen nicht außerhalb der enzymaktiven Orte in der Zelle gebunden oder absorbiert werden.

2.1.2. Ausgehend von den oben angeführten Grundforderungen, deren vollständige Erfüllung in der Enzymhistochemie zugunsten praktikabler Routinemethoden nicht immer ermöglicht werden kann, haben sich vier verschiedene Reaktionsprinzipien durchgesetzt:

1. Fällungsreaktionen

- a) Präzipitationsreaktionen mit Metallkationen (Gomori-Typ)
- b) simultane Azokupplung (1-Naphtylacetat-Esterase)
- c) Indigogenmethode
- d) Tetrazoliummethode (NADPD, G-3-P-DH, G-6-P-DH)

2. Sukzedane Azokupplung

3. Synthesereaktionen

4. Substratfilmverfahren (Proteinasen, Nucleasen, Amylasen)

Zu 1 b :

Zur Darstellung von Esterasen, Phosphatasen, Glykosidasen und Peptidasen wird mit zunehmendem Maße - so auch beim vorliegenden Nachweisverfahren bezüglich der 1-Naphtylacetatesterase - die simultane Azokupplung verwendet. Die Methode der Wahl zur intrazellulären Lokalisation und Untersuchung der Gesamtaktivität mit semipermeablen Membranen ist die simultane Azokupplung mit 1-Naphtylacetat und Hexazonium-p-rosanilin. Als Substrat werden unsubstituierte und substituierte Naphtol- sowie Naphtylaminderivate verwendet, als Kuppelsalze Diazoniumsalze mit unterschiedlichem chemischen Aufbau und Charakter (Fast Blue B, Fast Blue BB, Fast Blue RR, Hexazonium-p-rosanilin).

Da sich Diazoniumsalze im Inkubationsmedium relativ schnell zersetzen, (Hexazonium-p-rosanilin nach 15-20 min) muß das Medium sofort nach der Herstellung verwendet werden. Die Kupplungsgeschwindigkeit soll möglichst hoch sein. Außerdem ist auf die Hemmrate und die Partikelgröße des gebildeten Farbstoffes zu achten.

Zu 1 d:

Die Tetrazoliummethoden dienen zum Nachweis von Dehydrogenasen wie SDH, LDH, NADD und der Monoaminoxidase. Nach diesem Prinzip wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit NADPD, G-3-P-DH und G-6-P-DH gefärbt. Die biochemische Reaktion läuft dabei in mehreren Schritten ab:

Substratoxidation-Coenzymreduktion-Reduktion einer im Gewebe vorhandenen Tetrazoliumreduktase-Tetrazoliumreduktion. Es wurde nach dem Tetrazoliumverfahren gemäß LOJDA(26) vorgegangen.

Auf die übrigen, oben aufgeführten Reaktionsprinzipien wird nicht näher eingegangen, da sie die eigenen Untersuchungen nicht betreffen.

2.2.1. NADP - abhängige Diaphorase:

Zellen verfügen über mehrere Systeme zur Reoxydation des Coenzyms NADPH, wobei das Cytochrom P_{450} -System am endoplasmatischem Retikulum und in den Mitochondrien am bekanntesten ist (neben der Atmungskette mit Transhydrogenase oder NADPH-Cytochrom C_2 -Oxidoreduktase). Diese Redoxsysteme lassen sich derzeit jedoch histochemisch noch nicht direkt nachweisen.

Die NADPH-Oxidation kann aber auch von den als Diaphorasen bezeichneten Flavinenenzymen (TPN-Diaphorase oder Diaphorase II) katalysiert werden. Die Flavinenenzyme, die für die Reduktion von Tetrazoliumsalzen verantwortlich sind, heißen nach LOJDA(26) Tetrazoliumreduktasen (NADPH- bzw. NADPH-Tetrazoliumreduktase). Die NADP-abhängige Diaphorase ist relativ fest strukturgebunden im endoplasmatischen Retikulum.

Die Bedeutung der Tetrazoliumreduktasen in der Enzymhistochemie läßt sich nach LOJDA folgendermaßen zusammenfassen: Diaphorasen geben Auskunft über die intrazelluläre Oxidationskapazität, durch welche die reduzierten Coenzyme regeneriert werden können. Zudem sind die Tetrazoliumreduktasen in mehrfacher Hinsicht am Nachweis der coenzymabhängigen Dehydrogenasen ohne künstliche Elektronenakzeptoren beteiligt:

Einerseits bestimmen Diaphorasen die Lokalisation der zu untersuchenden Dehydrogenasen, andererseits können Tetrazoliumreduktasen die Dehydrogenase-Reaktion limitieren, da sie zwischen dem reduzierten Coenzym (Donator) und dem Akzeptor vermitteln. Sie nehmen Wasserstoff reversibel auf und geben ihn an verschiedene, u.a. auch künstliche Akzeptoren ab, wie z.B. Methylenblau, Ferricyanid und Tetrazoliumsalze. Im pH-Bereich von 7,2 bis 7,4, dem Nachweisbereich für die meisten Dehydrogenasen, werden die reduzierten Coenzyme äußerst effektiv oxidiert, während die noch ablaufende Reduktion der Tetrazoliumsalze praktisch vernachlässigt werden kann und erst ab einem pH von 8 eine bemerkbare Rolle zu spielen beginnt. Da die direkte Reduktion der Tetrazoliumsalze durch reduzierte Coenzyme bei pH 7,2-7,6 nicht effektiv ist, lassen sich mit den konventionellen Verfahren Dehydrogenasen an Stellen mit geringen Tetrazoliumreduktase-Aktivitäten nur ungenügend darstellen. Bei schwach aktiver Diaphorase erscheint daher die Dehydrogenasenaktivität artifiziell vermindert.

Neben den Coenzymen sind natürlich auch Substrat und Produkt als Redoxsysteme aufzufassen. Die genaue Reaktionsgleichung für die durch Dehydrogenasen katalysierte Oxidoreduktionsvorgänge lautet:



Färbemethode nach LOJDA(26):

Stammlösung für wässrige Inkubation:

(Diese Stammlösung wird gleichermaßen für NADP-Diaphorase wie zur Darstellung von Glucose-6-P-DH(s.2.2.2.) und Glycero-3-P-DH(s.2.2.3.) verwendet).

10,0 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 - 7,4

10,0 ml 0,1 - 0,4% Tetranitro BT(Serva etc.)

(Festsubstanzen lösen in 0,5 mlN,
N-Dimethylformamid,Merck, und 9,5 ml
Aqua dest. zugeben)

4,0 ml (0,05% Natrium oder 0,065% Kaliumcyanid
0,1 M,Merck,pH mit HCL auf 7,2 bringen)

4,0 ml 0,05 M 0,47% wasserfreies oder 1% krist.
Magnesiumchlorid(Merck)

8,0 ml Aqua destillata
(Stammlösung im Kühlschrank, besser
tiefgefroren aufbewahren)

2 ml "Stammlösung für wässrige Inkubation"(s.o.) in Abhängig-
keit von der nachzuweisenden Tetrazoliumreduktase

(2-)4 mg NADPH (Serva etc.) pH 7,2 - 7,6 kontrollieren;
filtrieren

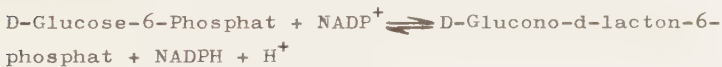
Inkubation: Frische Kryostatschnitte mit wässrigen Medien
40min(5-45min) bei Zimmertemperatur oder 37°C

Nachbehandlung: Wässrige Medien abgießen; 5-10min Post-
fixation bei Zimmertemperatur; Spülen in
Aqua dest.; Eindecken in Gelatinol(Glycerin-
Gelatine; Merck)

Ergebnis: Enzymaktive Stellen sind mit Tetranitro BT
blau-schwarz gefärbt

2.2.2. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

Die wesentlichen Reaktionen des Pentosephosphatzyklus (auch Hexosemonophosphat-Shunt genannt) sind die beiden NADP-abhängigen irreversiblen Oxidationen. Für den ersten Oxidationsvorgang an C-1 dient Glucose-6-phosphat als Substrat. Dabei wird Wasserstoff auf das Coenzym NADP übertragen und 6-Phosphogluconolacton gebildet. Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase stellt sich somit als eines der Schlüsselenzyme beim Glucoseabbau(bzw. beim Umwandlungsprozeß zur Hexose-Pentose-Epimerisation) dar. Sinn des Pentose-phosphatweges ist die Bereitstellung von NADP-H₂ im Cytosol, sowie die Synthese von Ribose-5-phosphat, welches für die Purinbiosynthese erforderlich ist. Das Enzym G-6-P-DH katalysiert folgende Reaktion:



Färbemethode(nach LOJDA 26):

unfixierte Kryostatschnitte

2 ml Stammlösung für wässrige Inkubation(s.2.2.1.)

(Aus Routinezwecken wurde nicht die Stammlösung für Gelinkubation verwendet)

0,2(0,08-0,4) ml 1M D-Glucose-6-phosphat +
Dinatriumsalz(Serva; 304 mg/1 ml

4(2 - 4) mg NADP⁺(Serva)

Mischen; pH kontrollieren,ggf.auf 7,2-7,6
einstellen

0,1 - 1 mg Phenazinmethosulfat(Serva);Filtrieren

Inkubation und Nachbehandlung wie bei NADPD (s.2.2.1.)

2.2.3. Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase

Als ein intramitochondrial gelegenes Flavoprotein besitzt Glycero-3-phosphat-Dehydrogenase als natürlichen Akzeptor Ubichinon. Allerdings existiert neben der mitochondrialen

auch eine extramitochondriale lösliche NAD-abhängige GPDH. Das Verhalten der mitochondrialen GPDH gegenüber Fixantien ähnelt dem der SDH und ist relativ fest strukturgebunden. Hohe Aktivitäten an GPDH zeigen sich u.a. an Nervenzellen, wobei sich die Aktivität durch Vitamin K₃ (Menadion) noch steigern läßt. Bei pH 7,6 liegt das pH-Optimum. Die Stellung von GPDH im Stoffwechsel liegt vor allem in seiner Bedeutung als Schlüsselenzym für die Triglyceridsynthese und Phospholipidsynthese.

Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase katalysiert folgende Reaktion:



Färbemethode (nach LOJDA (26):

unfixierte kryostatschnitte

2 ml Stammlösung für wässrige Inkubation (s. 2.2.1.)

(0,1-) 0,2 ml 1M D-Glycero-3-phosphat, Dinatriumsalz
(Serva; 324 mg/1 ml; Hexahydrat)

2-3 Tropfen 0,5% Menadion (Vitamin K₃, Menaphton,
2-Methyl-1,4-naphthochinon; Serva;
0,5 Menadion gelöst in 100ml Aceton)

mischen; pH kontrollieren, ggf. auf 7,2 - 7,6 einstellen

filtrieren

Inkubation und Nachbehandlung wie bei NADPD (2.2.1.)

2.2.4. 1-Naphthylacetatesterase

Unspezifische Esterasen wie z.B. die Naphthylacetatesterase kommen ubiquitär in pflanzlichen und tierischen Geweben vor. In Leber, Niere und Darm sind sie besonders aktiv. Intrazellulär finden sich die unspezifischen Esterasen im endoplasmatischen Retikulum, in den Lysosomen und evtl. auch intramitochondrial. Das pH-Optimum liegt zwischen 5 und 8.

Welche Rolle die unspezifischen Esterasen im Zellstoffwechsel spielen, ist noch nicht eindeutig geklärt.

Als gängige Nachweismethoden finden sich die Azokupplungsreaktion, sowie die Indigogen- und Schwermetallsalzreaktion. Als Methode der Wahl zur intrazellulären Lokalisation und Untersuchung der Gesamtaktivität mit semipermeablen Membranen wird die simultane Azokupplung mit 1-Naphtylacetat und Hexazonium-p-rosanilin durchgeführt, modifiziert nach DAVIS und HORNSTEIN.

Die unspezifischen Esterasen sind als Untergruppe der Carboxylesterhydrolasen klassifizierbar. Diese Enzyme katalysieren schematisch folgende in beiden Richtungen ablaufende Reaktion:



Färbemethode (nach LOJDA(26)):

Da die lysosomal und endoplasmatisch lokalisierte unspezifische Esterase(1-Naphtylacetatesterase) teilweise löslich ist, werden die frischen Kryostatschnitte mit Formaldehyd fixiert(möglichst reines Formalin 4%; 15 min).

50 ml 2,8% sekundäres Natriumphosphat(Merck)

3 ml(1,5-4,5 ml) Hexazonium-p-rosanilin(Anleitung s.u.); gut mischen; pH 6,5-7,4 einstellen

0,5(-1,0)ml 1% Naphtylacetat(Merck; 1g in 100 ml Aceton gelöst)

gut mischen und filtrieren

Inkubation: 10 min bei Zimmertemperatur oder 37° C

Nachbehandlung: Abgießen des Inkubationsmediums

spülen in aqua destillata

einstellen in 4% Formaldehyd, um Gasbläschenbildung im Eindeckmedium vorzubeugen (mehrere Stunden bei Zimmertemperatur).

spülen in Leitungswasser

eindecken in Glycerin-Gelatine(Merck)

Ergebnis:

Enzymaktive Stellen sind braun gefärbt. Der Schnitthintergrund erscheint hell bis tief gelb, in Abhängigkeit von Gewebevorbehandlung, Hexazonium-p-rosanilin-Konzentration und pH.

Herstellen von p-Rosanilin-Lösung nach LOJDA et al.(1964):

400 mg p-Rosanilin-HCl, p-Rosanilin, acridinfrei oder basisches Fuchsin(für Schiff'sches Reagenz; Merck; nur Chargen die ein gutes Schiff'sches Reagenz liefern, sind geeignet)

8 ml Aqua destillata

2 ml konz. HCl (36%)

gut mischen und filtrieren

Um hexazotiertes p-Rosanilin zu bekommen, werden gleiche Teile p-Rosanilin- bzw. Fuchsin-Lösung und 4% Natriumnitritlösung(NaNO_2 ; Merck; soll auch im Kühlschrank aufbewahrt nicht älter als eine Woche sein) unmittelbar vor Gebrauch zusammengegeben und gründlich gemischt. p-Rosaniline und Fuchsine, die Braun- oder sogar Rotbraunfärbung auch bei guter Hexazotierung beibehalten, ergeben zumeist unbefriedigende Ergebnisse.

2.3. Als Grundlage zu den durchgeführten enzymhistochemischen Untersuchungen diente Hirngewebe mit Kontusionsherden von insgesamt 69 Fällen gedeckter Schädel-Hirnverletzungen aus dem Obduktionsgut des Rechtsmedizinischen Instituts der LMU München der Jahre 1980 und 1981. Die Todesursache spielte bei der Auswahl keine Rolle. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle handelt es sich um Verkehrsunfälle, bei zwei Fällen ohne Überlebenszeit um Schußverletzungen.

2.3.1. Um primär traumatisch bedingte Rindenblutungen von sekundär kreislaufbedingten Gewebsschäden abzugrenzen,

wurde nach dem makroskopischen Bild der Rindenprellungs-herde vorgegangen (s. zur Differenzierung der primär mechanischen Schädigung von sekundären Schädigungen 1.2.0.). Die Gehirne wurden vollständig entnommen und in Frontalscheiben zerlegt, auf Kontusionsstellen inspiziert. Rindenareale, die deutliche kuppenständige Blutaustritte aufwiesen, wurden in einer Größenordnung von ungefähr 1 cm^3 (ideale Größe zum Tiefgefrieren und zur Gefrierschnittanfertigung) möglichst mit angrenzendem Windungstal entnommen. Zu Vergleichszwecken wurde an etwa entsprechender Stelle der unverletzten Hirnhemisphäre ebenfalls Gewebe entnommen. Danach wurden die Gewebsblöcke schnellstmöglich in einer Schnellgefrierkammer an einer Kohlendioxydbombe tiefgefroren und luftdicht in Plastikfolien verschweißt. Mit Sektionsnummer und Überlebenszeit markiert wurden die Gewebstücke augenblicklich in eine Tiefkühltruhe eingebracht und dort bei einer Temperatur von -20° bis -25° bis zum Schneidevorgang aufbewahrt.

Dabei wurden folgende Begleitdaten notiert:

1. Die gerichtliche Sektionsnummer zur Identifikation
2. Unfallzeitpunkt, Todeszeitpunkt und Überlebenszeit mittels Leichenschauchein und Polizeiberichten
3. Zeitpunkt der Einlieferung, des Einbringens der Leiche in die Kühlkammer, Zeitpunkt der Obduktion, nachträglich dann der Zeitpunkt des Schneide- und Färbevorgangs
4. Alter, Geschlecht, Unfallart, Todesursache, etwaige Brüche der Schädelkalotte und Hirndruckzeichen

Die Altersverteilung erfaßte beide Geschlechter und alle Altersgruppen in ausreichend zufälliger Verteilung.

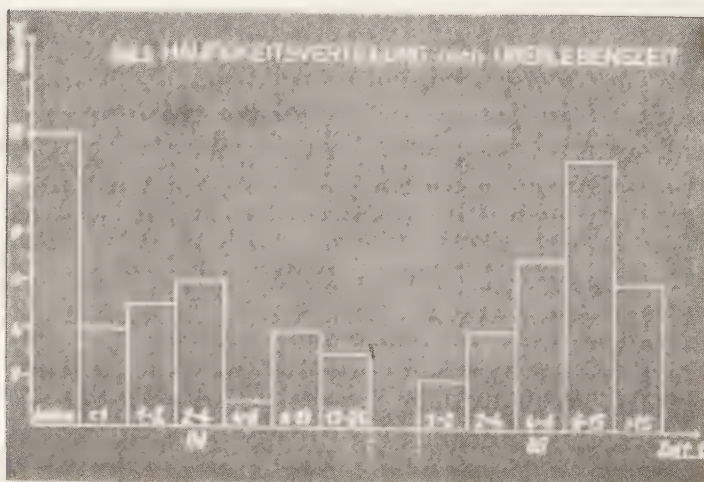
2.3.2. Insgesamt wurden 69 Fälle gedeckter Schädelhirntraumen ausgesucht, behandelt und mikroskopisch untersucht. Für einzelne Färbungen, so besonders für die frühzeitig diffundierende und sehr artefaktanfällige Glucose-6-phosphatdehydrogenase ergaben sich jedoch zum Teil geringere Zahlen an aussagekräftigen, verwertbaren Präparaten,

worauf bei der jeweiligen Befundbesprechung noch eingegangen wird.

Auf die Untersuchung offener Hirnkontusionen mit eröffneter Dura mater wurde verzichtet, um eine Verfälschung der Ergebnisse, beispielsweise durch eine bakterielle Kontamination, auszuschließen. So wurden im pathologischen Sinne verschobene enzymatische Aktivitätsveränderungen nichttraumatischer Kausalität vermieden, indem auch krankhaft veränderte Gehirne als Folge von schweren degenerativen oder konsumierenden Erkrankungen ausgespart blieben. Zentrale Blutungen, deren Schädigungsmuster und zeitlicher Reparatursablauf sich in aller Regel im Vergleich zu Hirnrindenverletzungen unterschiedlich darstellen, wurden ebenfalls nicht bearbeitet.

Entsprechend der 1. Tabelle erfolgte eine Einteilung der Fälle nach der Überlebenszeit in 12 Gruppen. Dabei zeigen sich zwei Gipfel:

Zum einen im Überlebensbereich von 6 - 15 Tagen, zum anderen bei sofortigem Todeseintritt nach erfolgtem Trauma. Im Bereich von 4 - 6 Stunden Überlebenszeit war nur ein aussagekräftiger Fall zu gewinnen.



2.3.3. Die postmortale Liegedauer bzw. Latenzzeit zwischen Todeseintritt und Obduktion zeigte bei den hier untersuchten 69 Fällen eine zum Teil erhebliche Schwankungsbreite; mehrheitlich jedoch - zu knapp 70% - betrug sie weniger als 48 Stunden. In 19 Fällen fand die Sektion weniger als 24 Std. nach dem Todeseintritt statt, in 28 Fällen einen Tag post mortem, in 13 Fällen 2 Tage danach, in 3 Fällen nach 3 Tagen, in 4 Fällen 4 Tage und in 2 Fällen 5 Tage nach dem Tode.

Sofort nach dem Tode beginnende Autolyseprozesse verändern die Aktivität und Lokalisation der Enzyme unterschiedlich stark, so daß zur Durchführung enzymhistochemischer Methoden in der Rechtsmedizin die postmortale Liegedauer so kurz als möglich gehalten werden sollte. MANN et al.(1978) zufolge ist ein Enzymaktivitätsverlust und die Diffusion von Enzymen im postmortalen Intervall auf Veränderungen zurückzuführen, welche aus folgenden Vorgängen resultieren:

Der Inaktivierung durch Inhibitoren, der Proteolyse oder einer Kombination von beiden. SPIELMEYER(54) zeigte bereits 1922, daß einige postmortale Veränderungen im Hirngewebe intravitalen hypoxämischen Veränderungen ähneln. Die daraus entstehenden Probleme bezüglich der Interpretation und Differenzierung von Nervenzellveränderungen in der frühen postmortalen Phase wurden zur Basis für zahlreiche intensive Forschungen und Diskussionen.

Einen diesbezüglichen Literaturüberblick zum Stand der Forschung über Enzymveränderungen und histomorphologische Veränderungen im Hirngewebe während des frühen postmortalen Intervalls veröffentlichte 1980 OEHMICHEN(29). Er stellte die Befunde über Enzymveränderungen aus dem Schrifttum bei 23 Enzymen(Transmitterenzyme und Enzyme des oxidativen Metabolismus) tabellarisch zusammen. Die Ergebnisse basierten zum Teil auf Untersuchungen an tierischem Gewebe, da für die sehr frühen postmortalen Intervalle menschliches Gewebe kaum erhältlich ist. Bei vorhandener Enzymaktivität ist die alte Streitfrage, ob intravitale(hypoxämische) oder

postmortale (autolytische) intrazelluläre Veränderungen vorliegen, weiterhin nicht mit letzter Sicherheit zu entscheiden. In der Regel waren lichtmikroskopisch erfaßbare, wesentliche Strukturveränderungen ebenso wenig wie wesentliche quantitative Veränderungen der biochemisch erfaßbaren Enzymaktivität während eines 6 - 8 Stunden dauernden postmortalen Intervalls zu erwarten. Qualitative Untersuchungen im Sinne von histoenzymatischen Untersuchungen sind gemäß OEHMICHEN's Übersichtsstudie (29) auch während länger dauernden Zeiträumen post mortem möglich und bei positivem Ausfall verwertbar.

Bezüglich der von uns untersuchten Enzyme werden nachfolgend - modifiziert nach OEHMICHEN (29) aus der Literatur - die bisherigen histochemischen Untersuchungsergebnisse stichpunktartig notiert:

1. NADP - Diaphorase

- a) BECKER, 1961; BECKER and BARRON, 1961; Rattenkleinhirn 37°C; Enzymstabilität 30-45 min; Nervenzellschwellung
- b) OEHMICHEN und GENCIC (32) 1980 b; Rattenkleinhirn; 22°C Enzymstabilität 48 Stunden postmortal gegeben

2. Glu-6-P-DH

LAZARUS et al. (23) 1962; Kaninchenkleinhirn; Raumtemperatur Enzymstabilität 24 h (nur bis 24 Stunden untersucht)

3. Gly-3-P-DH

- a) OEHMICHEN und GENCIC (32) 1980 b; Rattenhirn; 22°C Enzymstabilität 48 h postmortal gegeben
- b) CHASON et al. (5) 1963; Rattenhirn; 25°C Enzymstabilität 6 h (nur bis 6 Stunden untersucht)

4. Naphtylacetatesterase

OEHMICHEN und GENCIC (32) 1980 b; Rattenhirn; 22°C Enzymstabilität 24 h (untersucht aber bis 48 h)

Am Rattenhirn wurden 1980 von OEHMICHEN und GENCIC(32) histomorphologische und histoenzymatische Veränderungen postmortal dargestellt: "Als erste histomorphologische Veränderung wurde Dehydratation und Anschwellen und/oder Autolyse von Nervenzellen beobachtet." Enzymaktivitätsveränderungen wurden hauptsächlich durch Enzymdiffusion ins umliegende Gewebe charakterisiert; die Autoren nahmen an, daß hinsichtlich der Enzymaktivität der autolytische Prozeß nach dem "Alles-oder-Nichts-Gesetz" abläuft.

TYRER, EADLE und KUKUMS(57) lieferten einen Beitrag zur Aussagekräftigkeit der Stabilität oxidativer Enzyme in Abhängigkeit von Temperatur und postmortaler Liegedauer, die mittels Mikrospektrophotometer für die Purkinjezellen und die granuläre Schicht am Kaninchenkleinhirncortex nach 8 Std. bei 22° C noch 80% der Ausgangsaktivität an G-6-P-DH nachgewiesen werden konnten.

Auch LAZARUS et al.(23) fanden an Kleinhirnen von im Leichenkühlraum eintägig bzw. bei Raumtemperatur vierstündig aufbewahrten Kaninchen keine nennenswerten G-6-P-DH Aktivitätsveränderungen. Sie betonen, histochemische Methoden seien hauptsächlich qualitativ verwertbar, da sogar ausgeprägte quantitative Enzymaktivitätsveränderungen nicht apparent zu werden brauchen. Quantitative Ergebnisse speziell für Glutamat- und G-6-P-Dehydrogenase werden als unzuverlässig erachtet. Zufriedenstellende quantitative, histochemische Meßverfahren für andere oxidative Enzyme werden jedoch nicht ausgeschlossen.

2.3.4. Durch das Einfrieren sollen die im lebenden Organismus ablaufenden Stoffwechselvorgänge sofort unterbrochen und in dem Zustand belassen werden, in dem sie sich im Augenblick des Einfrierens befinden. Daher sollte das zu untersuchende Hirngewebe so schnell wie möglich nach Entnahme bei der Sektion in kleinen Blöcken(Kantenlänge etwa 1cm) tiefgefroren werden und bei -70°C gelagert werden. Autolyseprozesse werden damit verhindert und gleichzeitig das Gewebe für die

Schnitttherstellung gehärtet.

Die Enzymaktivität der hier untersuchten Enzyme ändert sich durch das Einfrieren kaum. Die Artefakte verursachende Eiskristallbildung hängt im wesentlichen von der Durchfrierungsgeschwindigkeit und damit auch der Größe der Gewebsblöcke ab. Deshalb wurde eine Kantenlänge von ca. 1cm nach Möglichkeit nicht überschritten.

Vier Arten des Einfrierens kommen in der Praxis in Frage:

1. in Aceton-Trockeneisgemisch-gekühltem Petroläther
2. in flüssigem Stickstoff
3. in Stickstoff-gekühltem Propan und
4. die von uns gewählte Methode des Einfrierens
in Kohlendioxydschnee

Diese Methode erschien uns, insbesondere im Hinblick auf eine praxisorientierte Verarbeitung, für unsere Fragestellungen am günstigsten.

2.3.5. Da ein zwischenzeitliches Auftauen zu teils massiver Kristallbildung und Zerreißung beim Schneiden führte, was eine Weiterverarbeitung und sichere Beurteilung erschwerte oder gar unmöglich machte, wurden die Gewebsblöcke ohne erneutes Anfrieren mit Hilfe eines temperaturabhängigen Klebstoffes befestigt. Die Schnitttherstellung erfolgte mit der heute üblichen Kryostatmethode an einem Cryo-Cut der AOI. Die optimale Schneidetemperatur betrug -10°C bis -12°C . Bei höheren Temperaturen wurde das Hirngewebe zu weich zur Schnittherstellung, bei tieferen Temperaturen wurde das Gewebe rissig und splitterte.

Die ideale Schnittdicke wird bei verschiedenen Autoren mit einer Streuung zwischen 5 und 16 μ angegeben, zum Teil sogar bis zu 30 μ . Bei den vorliegenden Fällen wurde mit der aus früheren Untersuchungen bewährten Schnittdicke von 10 μ gearbeitet, womit größtenteils eine ausreichend präzise Darstellung zu erzielen war.

Beim Schneidevorgang ist viel Erfahrung und Sorgfalt erforderlich, wobei folgende maßgeblich beteiligten Parameter besonders beachtet werden müssen:

1. Gute Schnitte sind nur dann möglich, wenn der Gewebsblock mit gleichbleibender, aber nicht zu hoher Geschwindigkeit, gegen das Messer bewegt wird.
2. Messerneigungswinkel (bei zu großer Inklinatlon Querwellenbildung bzw. Splitterung, bei zu geringer Neigung Zusammenschieben des Gewebes)
3. Beschaffenheit des Messers (scharf, sauber)
4. Festsitzen des Messers und des Messerträgers
5. Optimale Einstellung und Lage der Antirollplatte

Durch Heranführen eines zimmerwarmen Objektträgers werden die Gefrierschnitte aufgezogen und in einem Objektträgerhalter gestapelt, luftdicht verschweißt, bei -20°C bis zum anschließenden Färbevorgang aufbewahrt.

Nach dem histochemischen Färbevorgang wurden die Kryostat-schnitte mit Gelatinol und Deckglas eingedeckt. Das wasser-verträgliche, flüssige, alkoholfreie Gelatinol ist anderen Einbettmitteln wie "Eukitt" oder ähnlichen vorzuziehen, da Veränderungen durch Lösung oder Diffusion der Farbstoffe seltener zu beobachten sind. Ein leichter verschiebliches Deckglas kann dabei in Kauf genommen werden.

Zu den mikroskopischen Untersuchungen diente ein Mikroskop "Orthoplan" der Firma Leitz. Bei der Möglichkeit von

40 -, 100 -, 250 - und 400 facher Vergrößerung wurden wesentliche Befunde photographisch festgehalten.

C. ERGEBNISSE und BEFUNDE

3.1.0. NADPD - Normalbefund

Nach COLMANT(6) ist die Normalverteilung von NADPD im Rattenhirn differierend zu der von NADD. "Areale und laminäre Aktivitätsunterschiede im Kortex sind geringer als dort." Das Perikaryon der Ganglienzellen reagiert stets sehr deutlich. Bei der Glia ist die auffallend starke Anfärbbarkeit der Astrozyten hervorgehoben.

3.1.0.1. Befunde nach hypoxämischer Schädigung

COLMANT(6) stellte schon in den ersten Stunden nach hypoxämischer Hirngewebsschädigung deutliche Aktivitätsverluste im Neuropil fest. Hypoxämisch geschädigte Ganglienzellen zeigten schon bald einen Anfärbbarkeitsverlust, der nach etwa 30 Std. vollständig war. Bis zum 5. Tag waren im Nekroseherd und dem Randsaumgebiet vermehrt aktive einzelne Ganglienzellen sichtbar(vgl. THOMAS und PEARSE(56)). Zu einem späteren Zeitpunkt wurde diese Beobachtung nicht mehr gemacht.

Nach 13 Std. wurden erstmalig Achsenzyinderschwellungen beobachtet. In den früheren Phasen stellte sich im Randsaum, jedoch nicht im Nekroseherd selbst, eine erhöhte Aktivität der Astrozyten dar(gute Übereinstimmung mit dem NISSL-Präparat). In späteren Phasen gingen die starken Astrogliareaktionen weit über den Randsaumbereich hinaus. Bei weitem weniger deutlich war ab dem 3. Tag die am Randsaum oft wallartig wuchernde Mikroglia angefärbt, wobei Einzelzellen kaum zu erkennen waren. Nach Monaten bildeten sich die gliösen Reaktionen größtenteils zurück mit Ausnahme der Astroglia, welche vermehrt bestehen bleiben kann, ohne eine erhöhte Enzymaktivität gegenüber normalen Astrozyten aufzuweisen.

3.1.0.2. FRIEDE(10,11) erhielt bezüglich der Mikrogliazellen keine brauchbaren enzym-histochemische Daten. Verglichen mit den anderen zentralnervösen Zellarten fand er

in den normalen Astrozyten die schwächste Aktivität oxidativer Enzyme(demonstriert u.a. am Beispiel der NADPD). Dies sprach für deren geringen oxidativen Metabolismus, wohingegen der glykolytische Stoffwechsel in den Astrozyten dominiert. Pathologische, geschwollene Astrozyten zeigten jedoch eine große Aktivität oxidativer Enzyme. Astrozyten besitzen somit eine größere Anpassungsfähigkeit durch Enzymaktivitätsveränderungen als Nervenzellen oder Oligodendrogliazellen.

THOMAS und PEARSE(56) berichten über die solitären aktiven Zellen("solitary active cells") als vornehmlich in der Hirnrinde und im Corpus striatum lokalisiert. Diese einzelständigen, besonders stark anfärbbaren Nervenzellen erfüllen mit ihrem hohen Gehalt an NADPD eine besondere Stoffwechselleistung, die sich insbesondere durch die Synthesefunktion beim Aufbau biologischer Strukturen auszeichnet. Durch Antimetaboliten waren die "solitary active cells" im Tierversuch nicht beeinflussbar. Abschließend wird deshalb auf die neuropathologisch bekannten "Residualzellen" hingewiesen, die als Einzelzellen einen Gewebsuntergang überleben können und in Wirklichkeit als "solitary active cells" betrachtet werden können(s. auch 3.2.1.).

3.1.0.3. Nach chronischer Hypoxämie und akuter Ischämie KOZIK(17) erzeugte an gleichgeschlechtlichen weißen Ratten eine 24-stündige cerebrale Ischämie mittels Ligatur der linken A.carotis. Es resultierten kurzzeitig Enzymaktivitätssteigerungen vieler Dehydrogenasen - so auch der NADPH₂-tetrazolium-reductase. Bei akuter ischämischer Nervenzellschädigung sah KOZIK(17) im Neuropil nach 10 Std. einen beginnenden Intensitätsverlust, der sich nach 3 Tagen als eine nur noch minimale Aktivität im Neuropil und in den Perikarya nachweisen ließ. Akute Nervenzellschwellungen wurden nicht beobachtet.

In einem ähnlichen Versuch setzte SPECTOR(53) das Hirngewebe gleichgeschlechtlicher weißer Ratten einer 40 minütigen anoxisch-ischämischen Phase aus und beobachtete bis

zu 6 - 8 Std. posttraumatisch keinen merklichen NADPD-Aktivitätsabfall in der Hirnrinde. Der danach folgende Anfärbbarkeitsverlust war nach ca. 24 - 48 Std. wieder aufgehoben. Die wiedergekehrte Aktivität schien bei einigen Tieren größer im Vergleich zur unverletzten Kontrollseite.

3.1.0.4. Nach mechanischer und thermischer Schädigung KREUTZBERG und PETERS(20) stellten mit ihren enzymhistochemischen Beobachtungen bei experimentell aseptisch gesetzten Hirntraumen an erwachsenen Albinoratten die Aktivitätsveränderung oxidativer Enzyme im zeitlichen Längsschnitt dar: Die Hirnwunde wurde mittels steriler Injektionsnadel durch ein Trepanationsloch am rechten Scheitelbein bis zur Hirnbasis gesetzt. Schon 6 Std. nach diesem Eingriff ließen sich kugelige und birnenförmige Axonaufreibungen nachweisen. Dieser Befund ließ sich mit einer Silberfärbung bereits recht deutlich erkennen; ebenso ließ sich eine deutliche NADPD-Aktivität nachweisen.

3 - 4 Tage posttraumatisch fand sich eine verminderte Anzahl an Axonschwellungen, die sich bis zu 3 Wochen darstellten. Innerhalb des Läsionsbereiches trat regelmäßig und sehr früh eine Enzymaktivitätsverminderung ein.

48 Std. nach der Wundsetzung erfolgte am Wundrand, vornehmlich an der grauen Substanz eine Gefäßreaktion (Zellschwellung, beginnende Zellablösung) und eine Reaktion der Makro- und Mikroglia; auch Fettkörnchenzellen wurden festgestellt.

Am dritten posttraumatischen Tag verdeutlichten sich diese Erscheinungen, wobei die gestiegene NADPD-Aktivität vor allem in gliösen und mesodermalen Abräumzellen zu beobachten war.

Am 4. und 5. Tag waren bereits massenhaft Fettkörnchenzellen, Makroglia, deutlich zunehmend veränderte Mikroglia und Gefäßwucherungen zu erkennen. Die NADPD-Aktivität war besonders deutlich in der Astroglia, den Fettkörnchenzellen der Mikroglia und in den Zellen der randständigen Gefäße.

Nach sieben Tagen erschien die NADPD-Aktivität in den

randständigen Gefäßen und in den benachbart liegenden Astrozyten und Abräumzellen als markanter Randwall. Das Maximum der Gesamtenzymaktivität an NADPD wurde mit dem 6. posttraumatischen Tag erreicht. Die progressiv veränderte Mikroglia zeigte besonders hohe NADPD-Aktivität, welche am Ende der zweiten Woche sogar diejenige in den Astrozyten übertraf.

Die Hirnwunde war nach 3 Monaten wieder organisiert. Selbst in diesen Spätstadien war noch immer in unmittelbarer Herdnähe eine geringe Vermehrung der NADPD-Aktivität in der Oligodendroglia und der faserbildenden Glia zu beobachten.

3.1.0.5. Nach thermischer Schädigung

RUBINSTEIN et al.(46) berichteten bezüglich der Oxidoreduktasen, daß sich der Hirnrindenverletzungsbereich als gut abgrenzbare Zone mit einem vollständigen Anfärbbarkeitsverlust des kortikalen Neuropils darstellt. Sie gewannen mit ihren Versuchen, bei denen sie die Hirngewebsschädigung mittels Kälte(-50°C/1min) hervorriefen, die Erkenntnis, daß der Enzymaktivitätsschwund über den eigentlichen Nekroseherd hinausging. Die NADPD-Aktivität war im Cortex-Neuropil konstant schwächer als die der NADP. Im Mark bemerkten sie nach bereits 12 - 24 Std. eine Astroglia-Reaktion, wogegen KREUTZBERG(20) im Rindenbereich dies erst nach 48 Std. beobachtete. Da sich die weiteren Feststellungen vornehmlich auf das Mark beziehen, sind die von KREUTZBERG abweichenden Ergebnisse nicht direkt vergleichbar.

3.1.1. Eigene Ergebnisse:

Die Einteilung bezüglich der Latenzzeiten in 12 Gruppen ist aus Tab.1(S.19) zu ersehen.

3.1.1.1. NADP - Diaphorase

Gruppe 1: Sofortiger Todeseintritt

Der makroskopische Befund war den bei SDH und NADP von EISENMENGER und GILG(7,8) erhaltenen Ergebnissen vergleichbar: Bei ungestörter Gesamtintensität zeigte sich eine Ausparung der Blutung wie im Nativpräparat. Bezüglich der

Abschwächung eines Randsaumes um die Blutung, welche nur bei größeren, infiltrierenden Blutungen vorlag, ergab sich auch mikroskopisch ein gleicher Befund. Die Aktivität der Gefäße unterschied sich nicht von der unverletzter Hirngewebsareale. Die Nervenzellen fanden sich ohne Veränderung der Aktivität gut dargestellt. Wie bei der NAD-Diaphorase fiel in der peripheren Molekularschicht der Großhirnrinde eine Aktivitätsabschwächung des Neuropils um die Blutung auf. Unregelmäßig verteilt fanden sich sowohl in der Hirnrinde als auch im Mark (Abb.1, zentral) besonders intensiv tingierte einzelständige Nervenzellen, vergleichbar den von THOMAS und PEARSE(56) als "solitary active cells" bezeichneten Zellen. Granuläre extrazelluläre Enzymaktivität in nächster Nachbarschaft zu den Perikarya wurden des öfteren, jedoch in keiner der 12 nach Überlebenszeiten gestaffelten Gruppen regelmäßig beobachtet. Diese lokalen enzymatischen Aktivitätsverteilungen können kontusionsbedingt mit einer mechanischen Schädigung von Membranfunktionen erklärt werden.

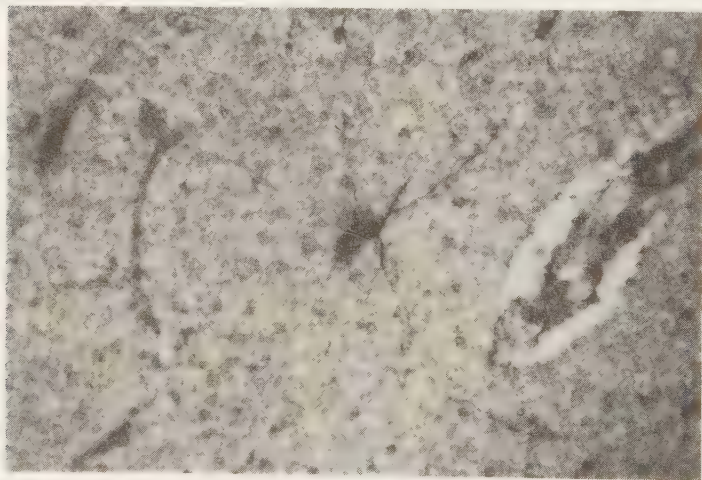


Abb.1: "Solitary active cell" im Mark,
NADP-Diaphorase, sofortiger Tod, 1:400

3.1.1.2. Gruppe 2: - 1 h Überlebenszeit

Bei Überlebenszeiten bis zu einer Stunde entsprachen die Befunde praktisch denen der 1. Gruppe mit sofortigem Todesseintritt. Auch hier war bei infiltrierenden Blutungen ein Aktivitätsverlust in dem die Blutung umgebenden Neuropil zustande gekommen. Eine deutliche, zeitliche Abgrenzbarkeit ergab sich weder mikroskopisch noch makroskopisch. Erstmals traten jedoch Nervenzellen mit abgeschwächter Anfärbung im Blutungsbezirk vermehrt auf.

3.1.1.3. Gruppe 3: 1 - 2 h Überlebenszeit

Auch bei Überlebenszeiten bis zu zwei Stunden waren keine wesentlichen neuen Aspekte für eine klare zeitliche Abgrenzung zu finden. Lediglich die Säume granulärer extrazellulärer Enzymaktivität um die Nervenzellen erschienen subjektiv deutlicher ausgeprägt zu sein als in den ersten beiden Zeitgruppen.

3.1.1.4. Gruppe 4: 2 - 4 h Überlebenszeit

Im Neuropil um die Blutungen trat eine abgeschwächte Anfärbung stetig in Erscheinung. Die Perikarya waren im Blutungsbereich gehäuft abgeblaßt und zum Teil nur noch als Schatten erkennbar. Quantitativ nahm die granuläre Enzymaktivität zu, die Bandbreite ließ bei den unterschiedlichen Präparaten dieser Gruppe jedoch keine feste Zuordnung zu.

3.1.1.5. Gruppe 5: 4 - 6 h Überlebenszeit

In der Gruppe der Überlebenszeiten von 4 bis 6 Stunden war die Anfärbung der Nervenzellen in der Blutung regelmäßig abgeschwächt. Auch hier wie bereits in der vorhergehenden Gruppe waren die Nervenzellen teilweise nur noch als Schatten zu erkennen. Im blaß angefärbten Neuropil in den Randsaumbezirken um die Blutungsstellen hatte die Färbung einiger Nervenzellen deutlich an Intensität verloren.

3.1.1.6. Gruppe 6: 6 - 13 h Überlebenszeit

Gegenüber der vorherigen Gruppe imponierte bei den Überlebenszeiten zwischen 6 und 13 Stunden die abgeschwächte

Anfärbung der Nervenzellen innerhalb des Blutungsareals. Häufig waren bei massiven Blutungen die Perikarya durch einen fast völligen Schwund der Tinktion gekennzeichnet (Abb.2).

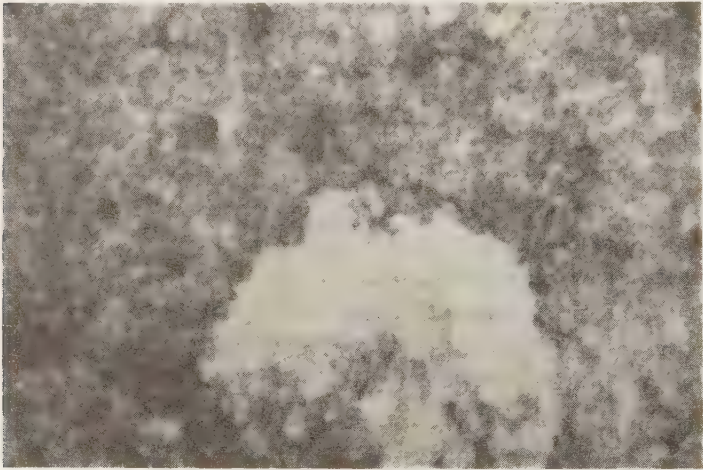


Abb.2: Massives Blutungsareal mit fast völligem Schwund von tingierten Perikarya, NADP-Diaphorase, 6-13 Std. Überlebenszeit, 1:100

Bei stärkerer Vergrößerung sah man in der lamina zonalis (= Molekularschicht; äußerste Gehirnrindenschicht) tropfenförmig an den Rand der Perikarya gedrängte Enzymmuster im Blutungsrandsaum. Auch granuläre, extrazelluläre Enzymaktivität, wohl als Folge mechanischer Schädigung der Nervenzellmembranen anzusehen, wurden im Blutungsrandsaum dieser Gruppe häufiger als in den vorhergehenden Zeitgruppen beobachtet. Erst in beträchtlichem Abstand von den Blutungsherden waren wieder normale Nervenzellen zu finden. Daneben erweckten einige einzelständige Nervenzellen den Eindruck deutlich gesteigerter Aktivität, die wiederum als "solitary active cells" gemäß THOMAS und PEARSE(55) angesehen werden können (Abb.3).

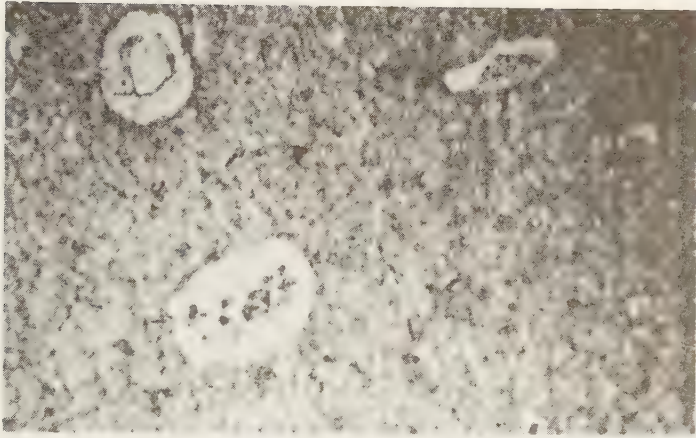


Abb.3: "Solitary active cell", NADP-Diaphorase
6-13 Std. Überlebenszeit, 1:40

3.1.1.7. Gruppe 7: 13 - 24 h Überlebenszeit

Auch in dieser Gruppe der Überlebenszeiten von 13 bis 24 Stunden wurden die bereits mehrfach angeführten "solitären aktiven Zellen" gefunden. Abb.4 zeigt neben derartigen "solitary active cells" in der Markzone beginnend auch faserförmige Astrozyten.

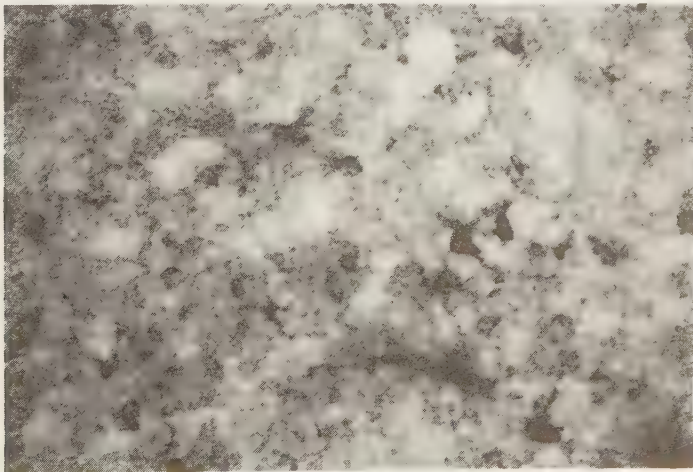


Abb.4: "Solitary active cells" und faserförmige
Astrozyten in der Markzone, NADP-Diaphorase
13-24 Std. Überlebenszeit, 1:400

In einem Fall (Abb.5), bei einer Überlebenszeit von 17 Stunden, konnte bereits eine deutliche Astrozytose im Mark entdeckt werden, wobei die Gliaaktivierung unter Umständen als eine überschießende Reaktion auf eine diffuse Schädigung im Mark bei einer ausgeprägten Rotationskomponente eines Schleudertraumas ausgelegt werden kann;

(Unfallart: Verkehrsunfall; Fußgänger/Pkw).

Eine angedeutete Reaktion der Astro- und Mikroglia im Blutungsbereich erfolgte ansonsten in der Regel erst nach 24 Stunden.



Abb.5 Beginnende Aktivierung der Astro-und Mikroglia im Mark unterhalb eines Rindenprellungsherd, NADP-Diaphorase, 17 Std. Überlebenszeit, 1:400

3.1.1.8. Gruppe 8: 1 - 2 d Überlebenszeit

Bei der Gruppe der Überlebenszeiten zwischen einem und zwei Tagen begann sich im Blutungsareal erstmalig eine angedeutete Gliareaktion abzuzeichnen, die allerdings

noch nicht regelmäßig in Erscheinung trat. Ansonsten ergaben sich keine wesentlichen neuen qualitativen oder quantitativen Veränderungen.

3.1.1.9. Gruppe 9: 2 - 4 d Überlebenszeit

Eine Gefäßreaktion mit NADPD-Aktivitätszunahme in den Gefäßelementen erfolgte ab 48 Stunden posttraumatisch am Blutungsrand in der Hirnrinde. Eine Aktivitätszunahme im Blutungsareal war bei gliösen und mesodermalen Abräumzellen, in den Astrozyten, den Fettkörnchenzellen, in den Hortegazellen(Synonym: Mikroglia, nach ULRICH I., Grundriß der Neuropathologie(58)) und in den bereits erwähnten randständigen Gefäßen zu beobachten. Die Aktivität in den Astrozyten erschien erstmals stetig ausgeprägt, was oft mit einer plumpen Vergrößerung der Zelleiber einherging.

3.1.2.1. Gruppe 10: 4 - 6 d Überlebenszeit

Zwischen dem 4. und 6. posttraumatischen Tag war die mikroskopisch bereits feststellbare beginnende Randwallbildung makroskopisch noch nicht durchgängig erfaßbar. In einer ausgedehnten Blutung an der Mark-Rindengrenze fanden sich mehrfach intensiv tingierte Astrozyten mit jetzt meist dickeren Zelleibern(Abb.6).



Abb.6: Intensiv tingierte Astrozyten im ausgedehnten Rindenprellungsherd, NADP-Diaphorase
4 - 6 d Überlebenszeit, 1:250

Der entstehende Randwall bildet sich aus Abräumzellen, reaktiven Astrozyten(= gemästete Glia), Makro- und Mikroglia, sowie aus tropfenförmiger, randständiger Enzymaktivität(Abb.7).

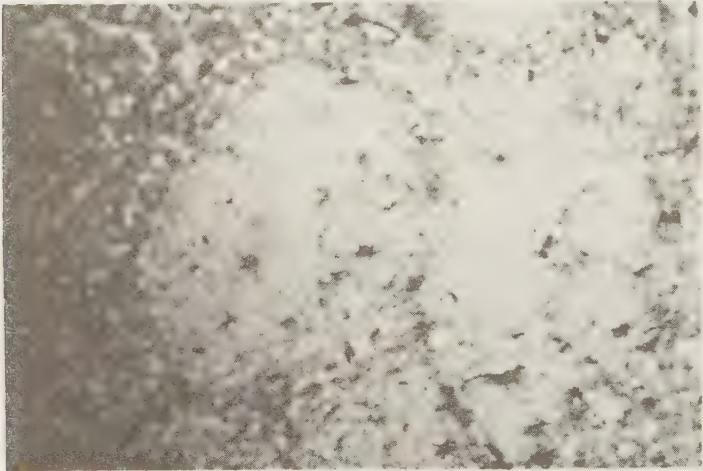


Abb.7: Randwallbildung mit vermehrter Astrozytenaktivität, NADP-Diaphorase
4 - 6 d Überlebenszeit, 1:250

Vermehrte Astrozytenaktivitäten zeigten sich nicht auf den Randwall allein beschränkt, sondern waren beständig auch innerhalb der Läsion sichtbar geworden.

3.1.2.2. Gruppe 11: 6 - 15 d Überlebenszeit
Fügte sich die Überlebenszeit zwischen 6 und 15 Tagen, traten die Randwallbildungen regelmäßig auf und waren schon makroskopisch erkennbar. Mikroskopisch bestand der Randwall(Abb.8) aus Gefäßsprossungen mit geschwollenen Endothelien, aus reaktiven Astrozyten und Abräumzellen. Ferner fanden sich im Randwall verstärkt diffus verteilte, grobtropfige, extrazelluläre Enzymaktivitäten.

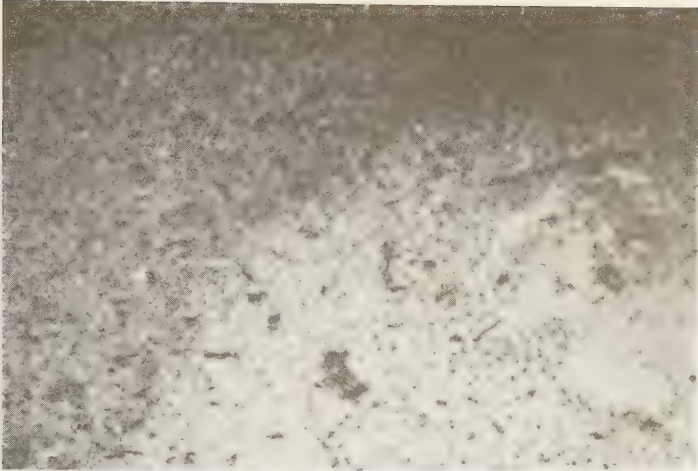


Abb.8: Randwallbildung nach 8 d Überlebenszeit
NADP-Diaphorase, 1:40

Die Astrozytose war besonders markant an der Mark-Rindengrenze ausgeprägt, wo der protoplasmatische Astrozytentyp, auch Kurzstrahler genannt, überwiegt:

Diese protoplasmatischen Astrozyten besitzen im Gegensatz zu den faserigen Langstrahlern der Molekularschicht sehr zahlreiche, kurze und stark verzweigte radiäre Plasmafortsätze. Eine deutliche Astrozytose wurde in einem Fall auch beidseits eines Rindentals gefunden, die auf der der Blutung zugewandten Seite stärker zur Geltung kam (Abb.9).

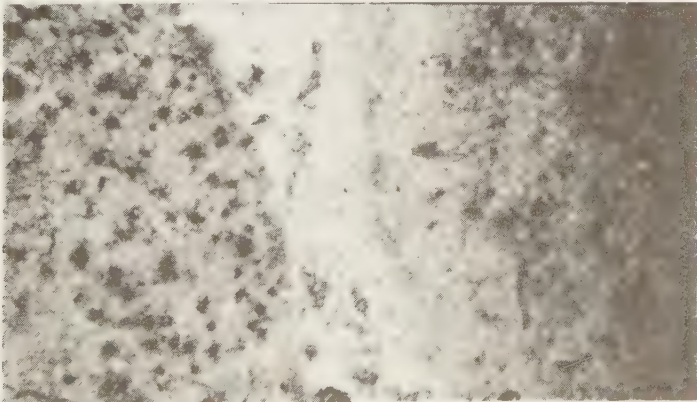


Abb.9: Deutliche Astrozytose beidseits eines
Rindentals, NADP-Diaphorase

Im Verletzungsareal der Rinde konnten bei einer Überlebenszeit von 14 Tagen noch die bereits häufig erwähnten "solitären aktiven Zellen"(s.1.O.2. etc.) entdeckt werden, die nach der Literatur eine große Resistenz gegen Schädigungen aufweisen(Abb.10). Die "solitary active cells", mit den in der Neuropathologie bekannten "Residualzellen" vermutlich identisch, konnten in nahezu allen Zeitgruppierungen, dort jedoch recht unregelmäßig, gesehen werden. Mit zunehmender Überlebenszeit innerhalb dieser Gruppe fand sich auch mehr und mehr die sog. gemästete Glia(Abb.10)



Abb.10: "Solitary active cells" im Blutungsbereich Rinde, 14 d Überlebenszeit, 1:400

3.1.2.3. Gruppe 12: länger als 15 d

Kontusionen, die mehr als 15 d überlebt wurden, verhielten sich qualitativ mit den ihnen eigenen, typischen Randwällen genauso wie die vorhergehende Überlebenszeitgruppe. Die Astrozytose ist nun jedoch über das gesamte Schnittpräparat verteilt(Abb.11). In der Abräumzone des Randwalls ließ sich gemästete Glia(reaktive Astrozyten) gut darstellen.

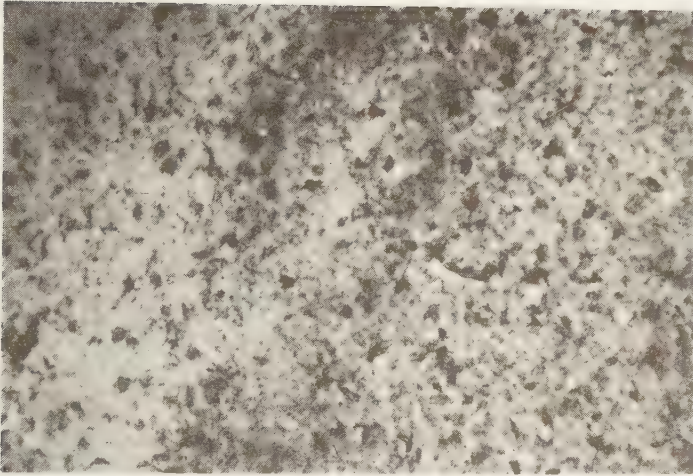


Abb.11: Randwall mit Astrozytose, NADP-Diaphorase
nach 15 d Überlebenszeit, 1:100

3.2.0. G-6-P-DH - Normalbefund

Nach COLMANT(6) entsprechen die normalen Verteilungsmuster im Rattenhirn denen der NADPD(s.3.1.1.); der Reaktionsausfall im Neuropil ist jedoch etwas schwächer als dort. Perikarya reagieren stets sehr deutlich. Bei der Glia sind besonders die Astrozyten deutlich anfärbbar.

3.2.1. (Bisherige Befunde nach chronischer hypoxämischer Schädigung und nach akuter Ischämie)

COLMANT(6) fand im Tierversuch nach Erreichen streng hypoxämischer Hirngewebsschäden eine erstmalige Abblassung unterschiedlicher Ausprägung im Neuropil ab 13 Std. nach der erreichten Hypoxämie. Ansonsten besteht weitgehende Ähnlichkeit mit den Befunden bezüglich der NADPD(s.3.1.1.), wobei aktivierte Astrozyten in der Herdumgebung jedoch etwas schwächer anfärbbar sind. Bei 2 der 15 Fälle wurden große protoplasmatische Astrozyten an der Gefäßwand intensiv dargestellt.

KOZIK(17) sah 16 - 20 Stunden nach hochdosierter Röntgenbestrahlung akut geschädigte, geschwellen-aufgetriebene Nervenzellen des Cortex. Intracytoplasmatisch gesteigerte G-6-P-DH - Aktivität fand sich in den Nervenzellen wie im Neuropil. Bei chronischer Nervenzellschädigung zeigte sich ebenfalls ziemlich eindeutig Enzymaktivität in den Perikarya.

In den "solitary active cells" nach THOMAS und PEARSE(56) (s.3.1.1.) liegt eine hohe Aktivität des Pentose-phosphatshuntinitiatorenzyms G-6-P-DH vor, während die beiden ebenfalls NADP-coenzymabhängigen Malat- und Isocitrat-Dehydrogenasen nur unregelmäßig und mit geringer Aktivität vorgefunden werden. Diese solitären "dark neurons" sind durch einen runden, blassen Kern mit dunklem Cytoplasma mit weit bis in die Peripherie verfolgbaren Fortsätzen gekennzeichnet. Histologische Untersuchungen an mehreren 100 durch Perfusion fixierten Tiergehirnen wurden 1978 von CAMMERMEYER(4) durchgeführt, welche ihn zur Vermutung veranlaßten, "daß die Verformungen bei der Herausnahme des Gehirns eine starke Beanspruchung in der Übergangszone zwischen grauer und weißer Substanz darstellen, so daß unvollständig fixierte Neuronen geschädigt werden können." Während CAMMERMEYER(4) das Auftreten von "dark neurons" als postmortalen Effekt vermutet, sprechen andere Ergebnisse doch mehr für eine vitale Reaktion, was auch von SOUZA,QUEIROZ et al.(49) 1978 unterstützt wird. Experimentell gesetzte Hirnstichverletzungen bei Tiergehirnen zeigten an, daß "dark neurons" traumatisch im vitalen Gehirn induzierbar seien und nicht als Fixierartefakte anzusehen sind.

3.2.2. (Nach mechanischer Schädigung)

KREITZBERG und PETERS(20) untersuchten das Enzymverhalten von experimentell-mechanisch gesetzten Hirngewebsläsionen bei Albinoratten. Die Ergebnisse der NADP-abhängigen G-6-P-DH entsprechen genau denen(schon in 3.1.0.4.) für die NADPD aufgeführten Resultaten.

3.2.3. Nach thermischer Schädigung RUPINSTEIN(46) berichtet bezüglich seiner mittels Kälte (minus $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$) hervorgerufenen Hirngewebsläsionen, das Neuropil im Nekrosebereich und teilweise darüber hinaus habe die Anfärbbarkeit vollständig verloren. Seine Ergebnisse über die Astrogliareaktion decken sich nicht mit denen von KREUTZBERG(20)(s.3.1.0.4.).

3.2.4. Eigene Ergebnisse:

Die Glu-6-P-DH tritt als NADP-abhängiges, nicht fest strukturgebundenes Enzym bei wässriger Inkubation leicht ins Medium über oder diffundiert ins Gewebe. Im Hinblick auf ein praxisorientiertes Verfahren erschien uns eine Unterdrückung der Diffusion durch visköse Inkubationsmedien wie Gele oder durch semipermeable Membranen als zu aufwendig. Unsere Ergebnisse waren aus diesem Grunde unbefriedigend. Nach KREUTZBERG und PETERS(20) sollten die Veränderungen aufgrund der NADP-Abhängigkeit denen der NADP-Diaphorase weitgehend entsprechen(s.3.2.2.). Die Veränderungen bei den kurzen Überlebenszeiten waren, nicht zuletzt auf Grund der offenbar geringeren postmortalen Stabilität im Vergleich zu anderen, biochemisch ähnlichen Enzymsystemen, relativ diskret. Im wesentlichen fanden wir lediglich eine uncharakteristische Randwallbildung aus tropfiger und granulärer Aktivität ab dem 5. Tag, die mit längerer Überlebenszeit zunahm(Abb.12).

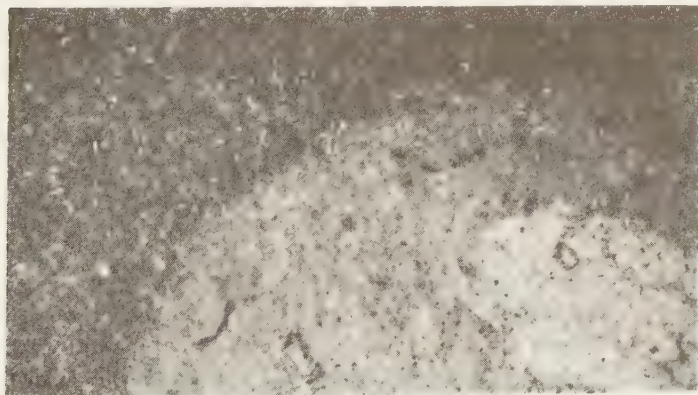


Abb.12: Randwall, Glu-6-P-DH, 1:40
15 d Überlebenszeit

3.3.0. G-3-P-DH - Normalbefund

Bei nicht geschädigter normaler Hirnsubstanz bei Ratten fand KOZIK(17) die Aktivität von G-3-P-DH hauptsächlich im Neuropil der Hirnrinde und des Plexus chorioideus. COLMANT(6) zufolge ist die Normalverteilung von G-3-P-DH der von NADD und SDH vergleichbar, auch hinsichtlich Glia und Ependym. Das Neuropil ist jedoch etwas schwächer angefärbt. Es zeigt eine durchwegs diffuse Färbung, die in den zentralen Schichten V und VI etwas stärker ist als in den peripheren Schichten I bis IV. Die Aktivität im Mark ist sehr viel geringer. Achsenzyylinder sind sehr schwach angefärbt. Am meisten Aktivität zeigt die Oligodendroglia in der weißen Substanz. Astrozyten lassen sich kaum, Mikroglia überhaupt nicht anfärben.

Mit Ausnahme der glatten Hirnarterienmuskelzellen lassen sich Hirngefäße kaum darstellen.

KOZIK(18) untersuchte 1980 die postmortale Enzymaktivität mehrerer Enzyme der Atmungskette, wobei die alpha-Glycero-F-DH die ausgeprägteste postmortale Enzymaktivität aufwies (starke Enzymaktivität bis 18 Std. postmortal). "Die Reihenfolge, in der diese Enzyme der Atmungskette postmortal an Aktivität abnahmen, ist genau umgekehrt wie die, in der diese Enzyme während der ontogenetischen Entwicklung erscheinen."

Mit anderen Worten:

Die ontogenetisch ältesten Enzyme der Atmungskette waren KOZIK(18) zufolge die postmortal stabilsten.

3.3.0.1. Nach akuter und chronischer Ischämie

Pathologisch veränderte, typischerweise geschwollene Nervenzellen als Folge von akuter ischämischer Schädigung ließen bei KOZIK(17) keine gesteigerte G-3-P-DH-Aktivität erkennen.

Auch bei chronischem Schädigungsmuster wurde für dieses Enzym keinerlei Aktivitätssteigerung in den Perikarya festgestellt. SPECTOR(53) berichtete, daß die Zonen II und III der Hirnrinde, sowie Hippocampus und Basalganglien auf

Anoxie(Ischämie) viel empfindlicher reagierten als die anderen Hirnareale. Er beobachtete keine eindeutige Anfärbbarkeitsabnahme der G-3-P-DH 6-8 Stunden nach hypoxämischer Schädigung. Nach 24 - 48 Stunden kehrte die Aktivität zurück und übertraf bei einigen Ratten die normale Aktivität der Hirnkontrollseite.

Nach COLMANT(6) ist nach hypoxämischer Schädigung die erste Abblassung im Neuropil erstmals nach 2,5 Stunden sichtbar. Im Randsaum des Nekroseherdes treten aktivierte Astrozyten schwach, aber doch deutlich erkennbar hervor; in den Spätphasen jedoch nicht mehr. Achsenzyklinderschwellungen färbten sich im Gegensatz zur Mikroglia gut an.

3.3.0.2. Nach thermischer Schädigung

RUBINSTEIN et al.(46), die bei ihren Versuchen die Hirngewebsläsion mittels Kälte(minus 50°C/min) hervorriefen, berichten - ähnlich wie bei der NADD, NADPD, G-6-P-DH und SDH - über eine Abschwächung der Anfärbbarkeit der Enzyme bis zum vollständigen Verlust, die über den eigentlichen Nekrosebereich noch hinausging. Ein unterschiedliches Enzymverhaltensmuster wurde bei der aktivierten, häufig Fettkörnchen enthaltenden Mikroglia, die ab dem 4. Tag nach Traumatisierung in und um den Läsionsbereich in Erscheinung traten, beobachtet. Dabei war die Enzymreaktion besonders hoch und konstant bei G-3-P-DH wie auch bei G-6-P-DH und NADPD.

3.3.1. Eigene Befunde

3.3.1.1. Gruppe 1: Sofortiger Todeseintritt

Die G-3-P-DH zeigte in ihrem überlebenszeitabhängigen Aktivitätsmuster keine wesentlichen Unterschiede zu den von EISENMENGER und GILG(7,8) gemachten Ergebnissen bezüglich des Verhaltens der SDH:

Bei sofortigem Tod waren die Blutungen, abhängig von der Größe und dem Ausmaß der Infiltrationen, in der Gesamtaktivität ausgespart(Abb.13). Eher verdrängend stellten

sich hier die multiplen kleinen Blutungen dar. Das Neuropil war im Randsaum teilweise nur geringfügig abgeschwächt. Dieser Tinktionsverlust in einer schmalen Zone um die Blutung war deutlicher bei infiltrativen als bei verdrängenden Blutungen zu finden. Nervenzellen im Rand der Blutungen waren teilweise blaß angefärbt, manchmal waren sie lediglich als Schatten zu erkennen.



Abb.13: Multiple kleine Blutungen, Glycero-3-P-Dehydrogenase, sofortiger Tod, 1:100

3.3.1.2. Gruppe 2: - 1 h Überlebenszeit

Bis zu einer Stunde posttraumatisch ergaben sich keine wesentlichen neuen Gesichtspunkte bezüglich einer Abgrenzbarkeit zur Gruppe 1.

3.3.1.3. Gruppe 3: 1 - 2 h Überlebenszeit

In der Gruppe der Überlebenszeiten von einer bis zwei Stunden ließen sich in größeren, infiltrierenden Blutungen abgeblaßte Nervenzellen, gerade noch als Nervenzellschatten erkennbar, häufiger als in den beiden Vorgruppen nachweisen. Auch die Nervenzellen im Randsaum größerer

Blutungen waren sehr deutlich abgeschwächt, wohingegen sehr kleine Blutungsbezirke in der Tinktion stark variierten und damit schwer einzuordnen waren.

3.3.1.4. Gruppe 4: 2 - 4 h Überlebenszeit

Auch in dieser Überlebenszeitgruppe lag eine von der Blutungsgröße bestimmte unterschiedliche Beurteilbarkeit vor. Bei größeren Blutungen war das Neuropil des leicht verbreiterten Randsaumes zumeist nur schwach tingiert.

3.3.1.5. Gruppe 5: 4 - 6 h Überlebenszeit

Bei Überlebenszeiten von 4 - 6 Stunden trat - unabhängig von der Blutungsgröße - immer eine abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um die Blutungen auf. Im Randsaum waren die Nervenzellen regelmäßig blaß angefärbt, innerhalb der Blutung waren zumeist nur noch Schatten von Nervenzellen dargestellt.

3.3.1.6. Gruppe 6: 6 - 13 h Überlebenszeit

Bei 6 - 13 Stunden Überlebenszeit änderte sich weder qualitativ noch quantitativ etwas gegenüber den Befunden der vorherigen Gruppe. Demgegenüber war bei dem sonst färbereich eng mit der G-3-P-DH korrespondierenden Enzym SDH bereits in dieser Zeitgruppe in den Blutungen keine Nervenzelle mehr angefärbt (EISENMENGER, GILG et al. (7,8)).

3.3.1.7. Gruppe 7: 13 - 24 h Überlebenszeit

Im Vergleich zu den Vorgruppen war mikroskopisch bei Überlebenszeiten von 13 - 24 Stunden ein markanter Unterschied feststellbar, charakterisiert durch den völligen Schwund der Nervenzellen im Blutungsbereich. Vereinzelt, jedoch noch nicht stetig, wurde auch schon eine Rarefizierung der Nervenzellen im Randsaum der Blutungsbezirke beobachtet.

3.3.1.8. Gruppe 8: 1 - 2 d Überlebenszeit

Diese Gruppe lieferte keine signifikanten Gesichtspunkte. Es lagen nur zwei Präparate vor, wovon beide mit vermutlich beim Färbvorgang entstandenen Artefakten solcherart versehen waren, daß sich eine sichere Beurteilung ausschloß.

3.3.1.9. Gruppe 9: 2 - 4 d Überlebenszeit

Hatten die Verletzten 2 - 4 Tage überlebt, war der Schwund der Nervenzellaktivität so weit fortgeschritten, daß sich in den Blutungszentren überhaupt keine, in den Randsäumen ganz selten schattenhaft angedeutete Nervenzellen färbereich darstellen ließen.

3.3.2.1. Gruppe 10: 4 - 6 d Überlebenszeit

Nach 13 - 24 Stunden Überlebenszeit war erstmalig im Randsaum ein Aktivitätsverlust der Nervenzellen feststellbar. Stetig trat ein vollständiger Schwund der Nervenzellen in den Blutungsrandzonen erst bei Überlebenszeiten zwischen 4 - 6 Tagen auf.

3.3.2.2. Gruppe 11: 6 - 15 d Überlebenszeit

Nach mehr als 6 Tagen fanden sich erstmalig Randwallbildungen mit tropfiger Aktivität entsprechend der Zone der Abraumzellen. Die entstehende Randwallbildung war aber bei weitem nicht so eindrucksvoll ausgeprägt wie im Vergleich zur SDH(EISENMENGER, GILG(7,8)). Eine Astrozytose oder eine vermehrte Astrozytenaktivität konnte nicht objektiviert werden.

3.3.2.3. Gruppe 12: länger als 15 d

Bei Überlebenszeiten von mehr als 15 Tagen zeigten sich keine neuen Aspekte. Eine deutliche Randwallbildung hatte sich nicht in allen Fällen gleichermaßen entwickelt.

3.4.0. Naphtylacetatesterase - Normalbefund

Nach der Darstellung von COLMANT(6) läßt sich das Neuropil deutlich anfärben, während das Mark praktisch nicht gefärbt ist. Die Nervenzellen fallen mit Kernaussparung und Hervortreten der Axone intensiv ins Auge. Gliazellen und Gefäße lassen sich kaum anfärben.

3.4.0.1. Unter pathologischen Bedingungen

KOZIK(17) stellte bei der akuten ischämischen Nervenzellschädigung nach SPIELMEYER(54) bis 24 Stunden nach gesetzter Hypoxie eine Aktivitätssteigerung fest. In ischämisch

veränderten Nervenzellen und im Neuropil folgte nach 72 Std. eine Aktivitätsabschwächung. Nach hochdosierter Röntgenbestrahlung sowie TET-Intoxikation wurde ein signifikanter Anstieg der unspezifischen Esterasenaktivität in den Nervenzellen der äußeren lamina granulosa (und des äußeren Teils des rhinencephalus) festgestellt. KOZIK(17) machte noch auf folgenden Schädigungsmusterunterschied aufmerksam:

Ischämisch geschädigte Nervenzellen zeigen Hyperaktivität an unspezifischen Esterasen, homogenisierte Purkinjezellen dagegen abgeschwächte Enzymaktivität. Eine schlüssige Antwort auf dieses unterschiedliche Verhalten läßt er jedoch offen.

Bei FRIEDE(10) wird bezüglich der Glia eine schwache Aktivitätszunahme "hypertrophierter Astrozyten" erwähnt. Allgemein läßt sich sagen, daß Veränderungen der unspezifischen Esterasen, insbesondere der Naphtyl-Acetat-Esterase, unter pathologischen Bedingungen bisher nicht sehr umfassend untersucht sind.

COLMANT(6) fand bei hypoxämischem Schädigungsmuster in den Frühphasen eine relativ schwache Anfärbbarkeit im Neuropil. Bei anfänglich schwach aufgehelltem Neuropil war noch nach 48 Stunden in ischämisch geschädigten Perikarya Restaktivität anzutreffen. Achsenzyklinderschwellungen, Mikrogliaaufwucherung und Astrozyten waren nicht nachweisbar. Nach den ersten Tagen zeigten die Kapillaren eine leicht veränderte Anfärbbarkeit.

3.4.1.1. Gruppe 1: Sofortiger Todeseintritt

Wie bei den anderen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Enzymen waren die Blutungen bereits makroskopisch als Ausparung in der Grundaktivität erkennbar. In Abhängigkeit vom Blutungstyp - infiltrierend oder eher verdrängend - war die Anfärbung im Neuropil um die Blutungen mehr oder weniger abgeschwächt. Bei infiltrierenden Blutungen war das Neuropil deutlich reduziert angefärbt, manchmal vollkommen ohne Tinktion. Dagegen fand sich bei mehr verdrängenden Blutungen keine abgeschwächte Färbung des Neuropils um die Blutungsareale (Abb. 15).

Innerhalb und am Rand des Blutungszentrums lassen sich mehrere kristalline Artefakte abgrenzen, welche vermutlich beim Färbevorgang nicht vollständig gelöste Natriumphosphatkristalle darstellen. Auch bei den meisten anderen Naphtyl-Acetat-Esterase Schnittpräparaten konnte diese Artefaktbildung nicht restlos vermieden werden, stellt aber insgesamt keine wesentliche Einschränkung der Beurteilbarkeit dar. Die Nervenzellen in den Blutungsherden waren z.T. nur noch als farblos-hellbräunliche Schatten zu identifizieren (Abb. 14). In anderen Präparaten waren die Nervenzellen in den Blutungen teilweise nicht abgebläßt und ganz normal rostbraun tingiert.

3.4.1.2. Gruppe 2: - 1 h Überlebenszeit

Bei Überlebenszeiten bis zu einer Stunde waren makroskopisch und mikroskopisch keine neuen Kriterien zur zeitlichen Gruppenabgrenzung feststellbar. Waren Blutungen eher verdrängend fanden sich auch hier keine abgeschwächten Blutungsrandzonen (Abb. 15). Die intensiv angefärbten Nervenzellen, deren Perikarya, Axone und Dendriten teilweise sehr gut zu differenzieren waren, traten innerhalb der Blutungen nur noch als Nervenzellschatten in Erscheinung.

3.4.1.3. Gruppe 3: 1 - 2 h Überlebenszeit

Bei Überlebenszeiten zwischen einer und zwei Stunden waren keine merkbaren Unterschiede zu den Befunden der beiden vorhergehenden Gruppen feststellbar.

3.4.1.4. Gruppe 4: 2 - 4 h Überlebenszeit

Auch in dieser zeitlichen Gruppe waren keine signifikanten Unterschiede quantitativer oder qualitativer Art zu den Befunden der Vorgruppen hervorgetreten.

3.4.1.5. Gruppe 5: 4 - 6 h Überlebenszeit

In der Gruppe der Überlebenszeiten zwischen 4 und 6 Stunden zeigten sich in den infiltrierten Blutungsrandern schmale, schwach aufgehellte Randsäume, was einem Aktivitätsverlust im Neuropil entspricht. Die Nervenzellen waren in diesen Randbereichen nicht abgeschwächt. Vereinzelt

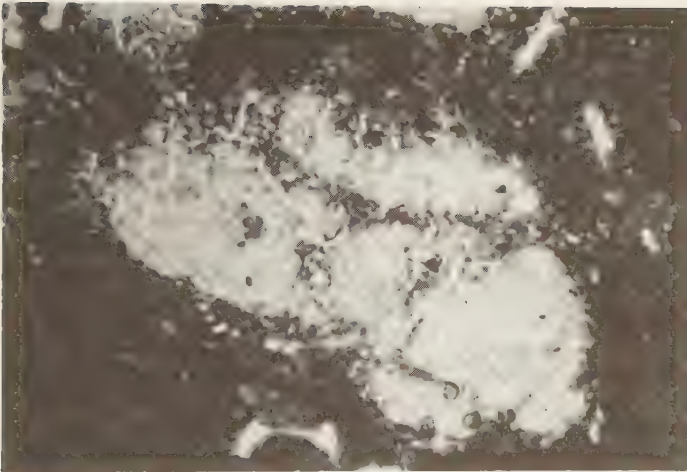


Abb.14: Mehrere kristalline Artefakte vor allem
im Blutungsbereich, Naphthyl-Acetat-Esterase
sofortiger Tod, 1:100

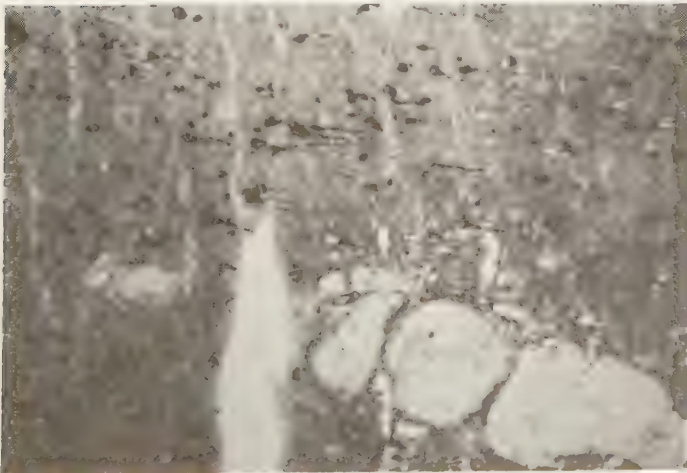


Abb.15: Verdrängende Blutungen ohne Tinktionsverlust
des Neuropils um die Blutungsareale, Naphthyl-
Acetat-Esterase, sofortiger Tod, 1:100

fanden sich auch im Zentrum der Blutungen gut dargestellte Nervenzellen.

3.4.1.6. Gruppe 6: 6 - 13 h Überlebenszeit

Nach 6 - 13 Stunden Überlebenszeit war in allen Fällen eine abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um die Blutungen aufgetreten. Die Nervenzellen im Randsaum waren dagegen größtenteils normal angefärbt. In den Blutungsbezirken fanden sich nun häufiger abgeblaßte, traumatisierte Nervenzellen; oft jedoch waren die Nervenzellen vollkommen unauffällig gegenüber den unverletzten Bezirken.

3.4.1.7. Gruppe 7: 13 - 24 h Überlebenszeit

In dieser Gruppe trat erstmalig ein eindeutiger Unterschied zu der von EISENMENGER et al.(7,8) untersuchten unspezifischen Esterase auf:

Waren in der Überlebenszeitgruppe von 13 - 24 Stunden bei der unspezifischen Esterase "im Blutungszentrum Nervenzellen nicht mehr angefärbt", so fanden sich bei der Naphtyl-Acetat-Esterase im Blutungsherd teils noch gut angefärbte, teils noch als Zellschatten erkennbare Nervenzellen(Abb.16).

Bei dieser Abbildung in 100-facher Vergrößerung ist die relativ kleine Blutung von einem sehr schmalen, gering abgeschwächten Randsaum umgeben, dessen äußere Abgrenzung durch einen Kranz von intensiv tingierten Nervenzellen gekennzeichnet ist. Ein nahezu vollkommener Schwund der Nervenzellen im Blutungsbereich war wie bei der unspezifischen Esterase erstmalig nach 13 - 24 Stunden zu beobachten(Abb.17). Hierbei liegt eine eher verdrängende große Blutung ohne erkennbare Astroglia vor.



Abb.16: Kleine Blutung mit Nervenzellen bis
zum Randsaum, Naphtyl-Acetat-Esterase,
13-24 Std. Überlebenszeit, 1:100

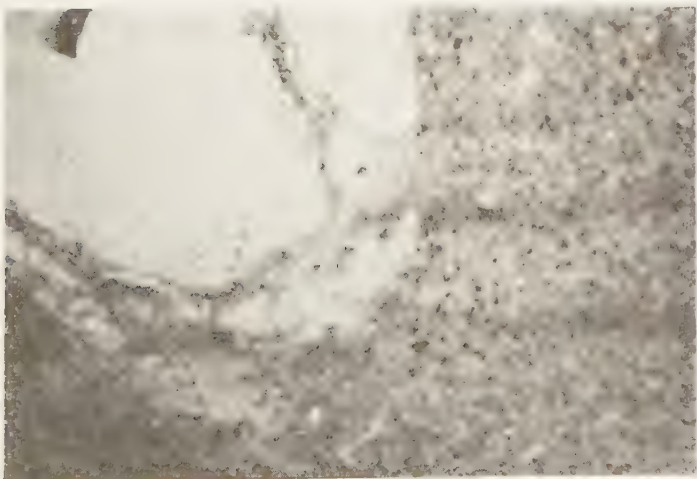


Abb.17: Im großen Blutungsareal keine erkenn-
bare Astroglia, Naphtyl-Acetat-Esterase,
13-24 Std. Überlebenszeit, 1:40

3.4.1.8: Gruppe 8: 1 - 2 d Überlebenszeit

Bei Überlebenszeiten von ein bis zwei Tagen waren keine wesentlichen neuen Gesichtspunkte für die zeitliche Abgrenzung hinzugetreten.

3.4.1.9. Gruppe 9: 2 - 4 d Überlebenszeit

Nach 2 - 4 Tagen Überlebenszeit wurde ein Schwund der Nervenzellen sowohl im Blutungszentrum als auch im Randsaumbereich regelmäßig beobachtet. Dies ergab den markantesten konstanten Befund bei der Naphtyl-Acetat-Esterase, wohingegen die unspezifische Esterase keine prägnante Parameter mit verlässlich stetigem Auftreten aufzeigte(EISENMENGER(7,8)).

3.4.2.1. Gruppe 10: 4 - 6 d Überlebenszeit

Im Vergleich zur Vorgruppe hatte sich bei Überlebenszeiten zwischen vier und sechs Tagen keine Befundänderung ergeben.

3.4.2.2. Gruppe 11: 6 - 15 d Überlebenszeit

In dieser Gruppe der Überlebenszeiten von 6 - 15 Tagen bildete sich erstmalig ein noch nicht sehr ausgeprägter Randwall mit tropfiger Enzymaktivität um die Blutungen - meist erst nach dem 8. Tag -. Da die Aktivität der Glia - insbesondere der Astrozyten - nur äußerst schwach in Erscheinung trat, hielt sich eine mikroskopisch gut darstellbare Randwallbildung in einem bescheidenen Rahmen(Abb.18).

3.4.2.3. Gruppe 12: länger als 15 d

Überlebenszeiten von mehr als 15 Tagen erbrachten keine signifikanten Unterscheidungsmerkmale bezüglich einer zeitlichen Abgrenzbarkeit zur Vorgruppe.

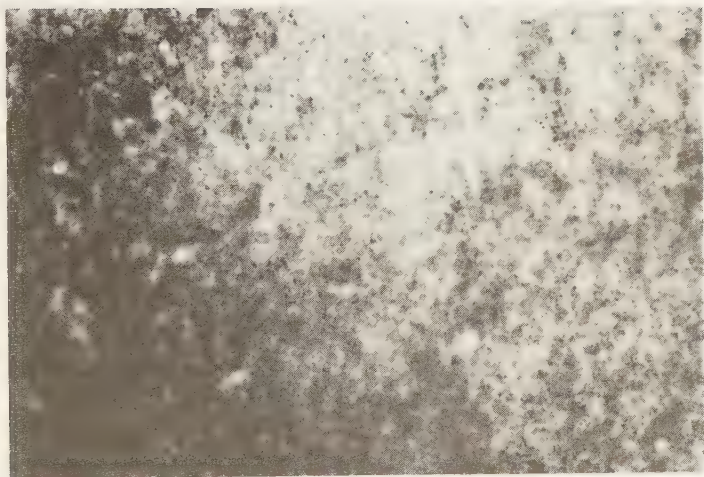


Abb.18: Randwallbildung nach 9 d Überlebens-
zeit, Naphthyl-Acetat-Esterase, 1:40

D. ZUSAMMENFASSUNG und DISKUSSION

4.0. Anhand in der Rechtsmedizin üblicher histologischer Routinemethoden (Paraffinschnitte) stellten 1978 OEHMICHEN und RAFF (29,30) histomorphologische Einzelkriterien bei Rindenprellungsherden entsprechend den unterschiedlichen zeitabhängigen histomorphologischen Veränderungen tabellarisch zusammen, was ihren Ergebnissen zufolge "in gewissen Grenzen praktisch verwendbare Rückschlüsse auf das jeweilige Alter eines Rindenprellungsherdes zuläßt." Über die zeitlichen Parameter pathophysiologischer Vorgänge bei Vernarbung von Rindenprellungsherden sei jedoch keine sichere Aussage möglich. Dazu seien zusätzliche elektronenmikroskopische und enzymhistochemische Untersuchungen notwendig.

Eine solcherart grenzwertorientierte Tabellierung histomorphologischer und enzymhistochemischer Veränderungen in zeitlicher Abstufung nach Überlebenszeiten bei gedeckten Schädelhirntraumen erbrachte erstmalig 1977 EISENMENGER (7) im Rahmen einer umfangreichen Übersichtsarbeit.

EISENMENGER, GILG et al. (7,8,12) berichteten über die Untersuchungen gedeckter Hirnrindenverletzungen mit histologischen und histochemischen Methoden. Zur Grenzwertbestimmung von Mindestüberlebenszeiten konnten dabei zahlreiche Einzelkriterien bezüglich Nervenzellen, Glia, Gefäße etc. gewonnen werden und Zeitpunkte konstanten Auftretens bestimmter Veränderungen fixiert werden. Anhand des histochemischen Verhaltens der Succinatdehydrogenase, der Lactatdehydrogenase, der unspezifischen Esterasen, der sauren und alkalischen Phosphatase und der NAD-Diaphorase wurde die prinzipielle Eignung der Histochemie zur Altersbestimmung von Hirnrindenverletzungen aufgezeigt. Auf Grund quantitativer Abstufungen von Farbnuancen, die einer gewissen subjektiven Beurteilung unterliegen, sollten histochemische Untersuchungen nur ergänzend zur Routinehistologie angewendet werden. Damit wird der in foro

geforderten an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit in dieser Fragestellung zumeist in vollem Umfange entprochen.

4.1. Die NADP-Diaphorase wies im Wesentlichen die gleichen posttraumatischen enzymhistochemischen Veränderungen an den Nervenzellen und im Neuropil auf wie das bereits von EISENMENGER, GILG et al. (7,8,12) untersuchte Coenzym NAD-Diaphorase:

Eine abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um Blutungen trat je nach Ausmaß und Größe der Gewebsinfiltration erstmalig schon bei sofortigem Todeseintritt auf, ein stetiges Auftreten war bei der NADPD jedoch erst nach 6 - 13 Stunden zu finden (bei der NADD vergleichsweise früher, nach 2 - 4 Stunden). Eine Abschwächung der Nervenzellen in der Blutung trat wie bei der NADD konstant nach 4 - 6 Stunden auf. Eine blasse Anfärbung der Nervenzellen im Randsaum der Blutung fand sich bei den beiden miteinander verglichenen Coenzymen gleichermaßen erstmalig nach 2 - 4 Stunden. Stetig trat ein Schwund der Nervenzellen im Blutungsbereich bei der NADPD nach 2 - 4 Tagen Überlebenszeit auf, bei der NADD dagegen schon nach 6 - 13 Stunden.

Deutlicher als bei der NADD zeigten sich sowohl in der Hirnrinde als auch im Mark besonders intensiv tingierte einzelständige Nervenzellen, vergleichbar den von THOMAS und PEARSE (56) als "solitary active cells" beschriebenen Zellen. Noch bei einer Überlebenszeit von 14 Tagen waren sie durch eine sehr hohe Resistenz gegen Schädigungen gekennzeichnet (Abb. 10). Bei diesen unregelmäßig in Rinde und Mark verteilten "solitary active cells" (Abb. 1) konnte kein eindeutiges Überlebenszeitabhängiges Verhalten festgestellt werden.

Eine Reaktion der Astro- und Mikroglia trat erstmals angedeutet nach 24 Stunden und stetig nach 2 - 4 Tagen auf. Ab diesem Überlebenszeitraum zeigte sich eine allgemeine Aktivitätszunahme verschiedener Abräumzellen, wobei sich eine eindeutige morphologische Zuordnung teilweise als schwierig erwies.

In corpore stellen die Hortegaabräumzellen mesenchymale, amöboid bewegliche Phagozyten dar, welche sich entsprechend ihrer Speicherfunktion in Fettkörnchenzellen umwandeln(ULRICH;58), wobei der zwischen Mikroglia und Fettkörnchenzellen bestehende, fließende morphologische Übergang eine exakte Differenzierung weiter erschwert. Eine erste Aktivitätszunahme der Astrozyten war bei der von EISENMENGER und GILG(7,8) bereits untersuchten NAD-Diaphorase mit genau viereinhalb Tagen Überlebenszeit deutlich später feststellbar als bei der nun zum Vergleich untersuchten NADPD-Diaphorase: Astrozytenaktivitätsbeginn schon nach 24 Stunden.

In einem Fall wurde sogar bereits bei einer Überlebenszeit von 17 Stunden eine deutliche Aktivierung der Astro- und Mikroglia im Mark(Abb.5) gefunden. Dies kann unter Umständen als eine überschießende Gliareaktion auf eine diffuse Markschädigung bei einer ausgeprägten Rotationskomponente eines Schleudertraumas(Unfallart: Verkehrsunfall;Pkw/Fußgänger) zurückgeführt werden.

Bezüglich einer Randwallbildung mit gesteigerter Aktivität wurde eine aussagekräftige zeitliche Zuordnung der früher untersuchten NAD-Diaphorase durch nahezu deckungsgleiche Ergebnisse bei der NADP-Diaphorase bestätigt: Eine deutliche aktivierte Randwallbildung - bestehend aus Abräumzellen, Astro- und Mikroglia sowie Gefäßwucherungen - war ab dem 4. Tag erstmalig zu erkennen; konstant waren diese Veränderungen bei einer Überlebenszeit von 6 - 15 Tagen. Bei Kontusionen mit einer Überlebenszeit von mehr als 15 Tagen fanden sich ebenso wie bei EISENMENGER,GILG(7,8) nur noch Abweichungen quantitativer Art: als Beispiel eine in Abb.11 über das gesamte Schnittpräparat verteilte Astrozytose.

4.2. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurde wegen ihrer NADPD-Abhängigkeit und der in diesem Zusammenhang von KREUTZBERG und PETERS(20) postulierten Auffassung untersucht, daß ihre enzymhistochemischen Veränderungen

weitgehend denen der NADP-Diaphorase entsprechen müßten. Die Veränderungen waren jedoch, vor allem bei den besonders interessierenden kurzen Überlebenszeiten, äußerst diskret.

Im Vergleich zu biochemisch ähnlichen Enzymsystemen war die postmortale Stabilität offenbar wesentlich geringer, weil Glu-6-P-DH als nicht fest strukturgebundenes Enzym bei wässriger Inkubation leicht ins Medium übertritt oder ins umliegende Gewebe diffundiert. Im Hinblick auf praxisorientierte Methoden erschien uns eine Unterdrückung der Diffusion durch visköse Inkubationsmedien (z.B. Gele) oder mittels semipermeabler Membranen als zu aufwendig.

Eine abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um Blutungen war erstmalig bei sofortigem Todeseintritt zu finden, ein Schwund der Nervenzellen im Randsaum trat nach 4 - 6 Tagen erstmalig auf. Ab dem 5. Tag fanden wir lediglich eine - mit längerer Überlebenszeit zunehmende - uncharakteristische Randwallbildung aus tropfiger und granulärer Aktivität (Abb. 12).

Aus obigen Gründen waren jedoch unsere Ergebnisse bei der Glu-6-P-Dehydrogenase insgesamt unbefriedigend.

4.3. Die Alpha-Glycerophosphat-Dehydrogenase stellt wie die bereits früher von EISENMENGER und GILG (7,8,12) untersuchte Succinatdehydrogenase (SDH) ein coenzymabhängiges intramitochondrial gelegenes Enzym dar.

Im wesentlichen konnten wir so die früheren Ergebnisse bezüglich der SDH mit der vergleichbaren Glycero-3-P-DH bestätigen:

So trat bei sofortigem Todeseintritt eine mäßig abgeschwächte Neuropilanfärbung um die Blutungen erstmalig, nach 4 - 6 Stunden konstant, auf. Bei sofortigem Todeseintritt zeigten sich bereits zum Teil abgeschwächt angefärbte Nervenzellen im Randsaum sowie innerhalb der Blutungen. Stetig war im Blutungsbereich nach 13 - 24 Stunden ein vollkommener Nervenzellschwund zu verzeichnen, wohingegen

im Randsaum ab dem 4. Tag regelmäßig keine Nervenzellen mehr anfärbbar waren. Ebenso analog zu den Ergebnissen der SDH konnten wir bei der Gly-3-P-DH erstmals nach mehr als 6 Tagen Randwallbildungen mit tropfiger Enzymaktivität beobachten. Eine deutliche Randwallbildung entwickelte sich jedoch nicht in allen Fällen gleichermaßen. Im Gegensatz zur SDH war eine vermehrte Astrozytenaktivität praktisch nicht nachweisbar.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Ergebnisse bezüglich der Alpha-Glycero-3-Phosphat-Dehydrogenase im wesentlichen denen der Succinatdehydrogenase entsprachen, d.h., daß eine relativ frühe Reaktion am deutlichsten an den Veränderungen im Neuropil zu erfassen ist.

Ansonsten setzt jedoch eine objektive Beurteilung auf Grund der schwachen Darstellbarkeit und relativ hohen Artefaktquote zumindest große Erfahrung voraus.

4.4. Die Naphtyl-Acetat-Esterase erwies sich als ein gegen Schädigung sehr widerstandsfähiges Enzym mit enger histochemischer Korrelation zu den Ergebnissen der früher von EISENMENGER, GILG et al. (7,8) untersuchten unspezifischen Esterase.

Dementsprechend fanden wir für die früheste enzymhistochemische Veränderung eine Bestätigung der früheren Untersuchungen, nämlich eine erstmalige abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um Blutungen bei sofortigem Todeseintritt und ein stetiges derartiges Auftreten nach 6 - 13 Stunden Überlebenszeit.

Ein Schwund der Nervenzellen im Blutungsbereich sowie im Randsaum wurde nach 2 - 4 Tagen regelmäßig beobachtet. Da die Aktivität der Glia - insbesondere der Astrozyten - nur äußerst schwach in Erscheinung trat, hielt sich eine mikroskopisch gut darstellbare Randwallbildung zumeist in bescheidenem Rahmen. Eine Randwallbildung mit tropfiger Enzymaktivität war daher erstmalig sehr diskret nach 8 Tagen Überlebenszeit zu erkennen.

Zusammenfassend war die Naphtyl-Acetat-Esterase der früher untersuchten unspezifischen Esterase im enzym-histochemischen Verhalten vergleichbar - verbunden mit einer besonders guten Darstellbarkeit der Nervenzellen.

Eine kristalline Artefaktbildung - vermutlich durch beim Färbevorgang nicht vollständig gelöste Natriumphosphatkristalle bedingt - konnte nicht restlos vermieden werden, stellte aber insgesamt keine wesentliche Beurteilungseinschränkung dar.

4.5. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß bei den vier von uns untersuchten Enzymen mit Ausnahme der Glucose-6-P-Dehydrogenase die histochemischen Ergebnisse vergleichbar sind mit den bereits früher von EISENMENGER und GILG et al.(7,8,12) am Verhalten anderer Enzyme gewonnenen Erkenntnisse.

Allerdings erwies sich die postmortale Stabilität der nicht strukturgebundenen Glucose-6-P-DH als zu gering, was annäherungsweise auch am Kaninchenkleinhirn von OEHMICHEN(31) festgestellt wurde. Im Rahmen eines 1980 veröffentlichten Übersichtsreferates zum: "Stand der Forschung über Enzymveränderungen im Hirngewebe" ist OEHMICHEN(31) zufolge zumindest bei vielen bis dato erforschten Enzymen eine histochemische Beurteilung auf zellulärer Ebene mit dem Lichtmikroskop bis zu einem postmortalem Intervall von 48 Stunden möglich.

Dies deckte sich mit den bereits früher von EISENMENGER, GILG et al.(7,8,12) gemachten Erfahrungen bezüglich ihrer Untersuchungen "zur histologischen und histochemischen Altersbestimmung gedeckter Hirnrindenverletzungen", wonach eine Enzymstabilität etwa bis zu einer 48-stündigen postmortalen Liegedauer vorliegt.

Erneut bestätigt wurde dies durch die Mehrzahl unserer Fälle, von denen rund 70% bei einer postmortalen Liegedauer von weniger als 48 Stunden obduziert und sofort tiefgefroren konserviert bzw. verarbeitet wurden. Für diesen Zeitraum war von einer postmortalen Stabilität der von uns an der menschlichen Hirnrinde untersuchten Enzyme NADP-Diaphorase, Glycero-3-P-DH und Naphtylacetat-Esterase auszugehen. Lediglich die Glucose-6-P-DH zeigte im Vergleich zu bei OEHNICHEN(31) gewonnenen Ergebnissen eine bedeutend geringere postmortale Stabilität von nur 24 Stunden.

4.6. Zusammenfassung

In Anknüpfung an frühere Untersuchungen anderer Enzyme wurde das Verhalten der im Titel genannten Enzyme bei gedeckten Hirnrindenverletzungen untersucht und auf die praktische Anwendbarkeit zur Altersbestimmung von Hirnrindenverletzungen überprüft. Die Ergebnisse bestätigen die Auffassung von EISENMENGER, GILG et al.(7,8,12), daß sich durch die Enzymhistochemie zusätzliche Kriterien zur Altersbestimmung von Hirnrindenverletzungen finden lassen.

Gegenüber der Routinehistologie erfordern die enzymhistochemischen Methoden mehr Erfahrung und wesentlich aufwendigere, konstant gleichbleibende Verarbeitung und Labortechnik.

Wie bei den früher untersuchten Enzymen ergab sich, daß eine durchaus erfaßbare quantitative Abstufung von Farbnuancen bei kurzen Überlebenszeiten von der Blutungsgröße, der Infiltrationstiefe und nicht zuletzt von der subjektiven Beurteilung abhängt. Eine Ausnahme stellt die durch die NADP-Diaphorase möglicherweise früher als mit der Routinehistologie erfaßbare Reaktion der Astro- und Mikroglia dar, die zum Teil bereits nach 17 - 20

stündiger Überlebenszeit eine deutliche proliferative Aktivitätszunahme aufwies.

Insgesamt zeigte sich wiederum, daß die Enzymhistochemie prinzipiell zur Altersbestimmung gedeckter Hirnrindenverletzungen geeignet ist, die praktische Anwendbarkeit aus rechtsmedizinischer Sicht jedoch durch die subjektive Bewertung bei der Beurteilung quantitativer Farbunterschiede begrenzt wird. Auch durch diese Untersuchung weiterer vier Enzyme wird bestätigt, daß histochemische Untersuchungen nur in Ergänzung zur Histologie Anwendung finden sollten.

Enzymhistochemische, grenzwertorientierte Kriterien, die sich ergänzend zur Routinehistologie zur Altersbestimmung von gedeckten Hirnrindenverletzungen eignen, wurden im folgenden tabellarisch zusammengestellt.

NADP - Diaphorase

	Erstes Auftreten	Stetiges Auftreten
Abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um Blutungen	sofortiger Tod	6-13 Std.
Abgeschwächte Anfärbung der Nervenzellen in der Blutung	bis 1 Std.	4-6 Std.
Blaß angefärbte Nerven- zellen im Randsaum der Blutung	2-4 Std.	6-13 Std.
Schwund der Nervenzellen im Blutungsbereich	2-4 Std.	2-4 Tage
Schwund der Nervenzellen im Randsaum	4-6 Std.	-----
Gliareaktion im Blutungsbereich	17-20 Std.	2-4 Tage
Randwallbildung aus Gefäßen, Astro- und Mikroglia und Abräumzellen	4-6. Tag	6-15. Tag

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase

	Erstes Auftreten	Stetiges Auftreten
Abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um Blutungen	sofortiger Tod	
Abgeschwächte Anfärbung der Nervenzellen in der Blutung	unsicher	
Blaß angefärbte Nerven- zellen im Randsaum der Blutung		
Schwund der Nervenzellen im Blutungsbereich		
Schwund der Nervenzellen im Randsaum	4-6 Tage	
Gliareaktion im Blutungsbereich		
Randwallbildung (mit tropfiger und granulärer Enzym- aktivität)	ab 5. Tag	

Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase

	Erstes Auftreten	Stetiges Auftreten
Abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um Blutungen	sofortiger Tod (nur geringfügig)	4-6 Std.
Abgeschwächte Anfärbung der Nervenzellen in der Blutung	sofortiger Tod	-----
Blaß angefärbte Nerven- zellen im Randsaum der Blutung	sofortiger Tod	4-6 Std.
Schwund der Nervenzellen im Blutungsbereich	sofortiger Tod	13-24 Std.
Schwund der Nervenzellen im Randsaum	13-24 Std.	4-6 Tage
Gliareaktion im Blutungsbereich	-----	-----
Randwallbildung (mit tropfiger Enzym- aktivität; ohne Astro- zytenaktivität)	nach 6 Tagen	-----

Naphtylacetat-Esterase

	Erstes Auftreten	Stetiges Auftreten
Abgeschwächte Anfärbung im Neuropil um Blutungen	sofortiger Tod	6-13 Std.
Abgeschwächte Anfärbung der Nervenzellen in der Blutung	sofortiger Tod	-----
Elaß anfefärbte Nerven- zellen im Randsaum der Blutung		
Schwund der Nervenzellen im Blutungsbereich	13-24 Std.	2-4 Tage
Schwund der Nervenzellen im Randsaum	13-24 Std.	2-4 Tage
Gliareaktion im Blutungsbereich		
Randwallbildung (mit tropfiger Enzymaktivität)	6-15 Tage	-----

LITERATURVERZEICHNIS

1. ARNOLD, M.:
Histochemie: Einführung in Grundlagen und
Prinzipien der Methode
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1968
2. BERG, S.:
Der Beweiswert der Todeszeitbestimmung
Beitr.gerichtl.Med.25,1969
3. BRATZKE, H. und KRAULAND, W.:
Traumatische subdurale Blutungen und
Marklagerblutungen
Beitr.gerichtl.Med.XXXVI,296,1978
4. CAMMERMEYER, J.:
(Labor.Neuropath. and Neuroanat.Sci.)
Histochemistry(Berlin) 56, 97-115(1978)
5. CHASON, J.L.:
Enzymhistochemistry in postmortem nervous system,
in: Neuropathology Methods and Diagnosis
6. COLMANT, H.J.:
Zerebrale Hypoxie
Thieme Verlag, Stuttgart, 1965
7. EISENMENGER, W.:
Zur histologischen und histochemischen Alters-
bestimmung gedeckter Hirnrindenverletzungen
Habil.schrift,München,1977(Maschinenschrift)
8. EISENMENGER, W.,GILG, T. et al.:
Zur histologischen und histochemischen Alters-
bestimmung gedeckter Hirnrindenverletzungen
Beitr.gerichtl.Med.XXXVI,281-289,1978

9. FISCHER, H. und W. SPANN
Pathologie des Trauma
Bergmann-Verlag, München, 1967
10. FRIEDE, R.L.
Topographic Brain Chemistry
Academic Press, New York - London, 1966
11. FRIEDE, R.L.:
The cytochemistry of normal and reactive astrocytes
J. Neuropath. Exp. Neurol., 1962
12. GILG, T.:
Zeitabhängige Veränderungen der Succinatdehydrogenase
und NAD-Diaphorase und postmortale Altersbestimmung
gedeckter Hirnrindenverletzungen
Inaug. Diss., München, 1978
13. GOMORI, G.:
Microtechnical demonstration of phosphatase in
tissue sections
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.), 1939
14. GREENFIELD's Neuropathology:
Ed. W. Blackwood, J.A.N. Corsellis
3. Auflage, Arnold, London 1976
15. GRAUMANN, W. und K.H. NEUMANN:
Handbuch der Histochemie
Fischer-Verl., Stuttgart, 1977
16. KIENE, S. und J. KÜLZ:
Schwere cranio-zerebrale Verletzungen im Kindesalter,
Frühverlauf und Endresultate aus chirurg. Sicht
Bruns. Beiträge 210, 224, 1965
17. KOZIK, M.:
Histochemistry of neuronal degenerative changes
J. Hirnf., 1975

18. KOZIK, M.:
Postmortem activity of respiratory enzymes in human
brains 1980
(Dep. of Neuropath., Acad. of Med., Poland)
19. KRAULAND, W.
Über die Zeitbestimmung von Schädelhirnverletzungen
Beitr.gerichtl.Med.1973
20. KREUTZBERG, G.W. und G. PETERS:
Enzymhistochemische Beobachtungen beim experimentellen
Hirntrauma der Ratte
Extrait du Livre jubilaire du Dr. Ludo van Bogaert, 1962
21. KREUTZBERG, G.W.:
Aspekte der Zellbiologie und Zellpathologie des Neurons
Äsopus-Verl., Lugano-München-Milano, 1975
22. LANKSCH, W., GRUMME, T., KAZNER, E.:
Schädel-Hirn-Verletzungen im Computertomogramm
DÄB 39, 2327-2332(1977)
23. LAZARUS, S.S. et al.:
Enzyme localization in rabbit cerebellum and
effect of postmortem autolysis
J.Neurochemistry, 9, 227, 1962
24. LISON, L.:
Bull.Soc.Chim.biol., 1936
zitiert nach:
25. LISON, L.:
Histochimie et Cytochimie animales
Paris, Gauthiers-Villars, 1960
26. LOJDA, Z., R.GOSSRAU und F.H. SCHIEBLER:
Enzymhistochemische Methoden
Springer-Verl., Berlin-Heidelberg-New York, 1976

27. NAEVE, W. und H.W.BAUSE:
Experimentelle postmortale Kopf- und Hirnverletzungen
Z. ges. gerichtl. Med. 74, 187, 1974
28. OEHMICHEN, M., W. EISENMENGER und G.RAFF:
Theoretisch-experimentelle und statistische Grundlagen
zur zytomorphologischen Altersbestimmung
traumatischer Rindenblutungen
Beitr.z.gerichtl.Med.Bd.XXXIX 57-72, 1981
29. OEHMICHEN, M., G. RAFF:
Timing of cortical contusion-correlation between histo-
morphologic alterations and post-traumatic interval
Z.Rechtsmed.84,79-94,1980
30. OEHMICHEN, M., G. RAFF:
Zeitabhängige histomorphologische Veränderungen von
Rindenprellungsherden nach Contusio Cerebri
Beitr.gerichtl.Med.XXXVI,291-294,1978
31. OEHMICHEN, M.:
Enzyme alterations in brain tissue during the early
postmortal interval with reference to the histo-
morphology: Review of the Literature
Z.Rechtsmed.85,81-95,1980
32. OEHMICHEN, M. und M. GENCIC:
Postmortal Histomorphologie und Histoenzymatic
alterations in Rats brain
Institut of Forensic Medicine Tübingen
Path.Res.Pract.169, 72-83,1980
33. PETERS, G:
Klinische Neuropathologie
Thieme-Verl., Stuttgart, 1970

34. PETERS, G.:

Die gedeckten Gehirn- und Rückenmarksverletzungen
in: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie
und Histologie, Bd. XIII, 3

Hrsg. W. Scholz, Springer Verl., Berlin-Heidelberg-New York, 1955

35. PETERS, G.:

Die Hirnverletzungen in: Neuro-Traumatologie, Bd. I

Hrsg. F. Kessel, L. Guttmann und G. Maurer

Urban und Schwarzenberg, München, 1969

36. PIOCH, W.:

Die histochemische Untersuchung thermischer Hautschäden
und ihre Bedeutung für die forensische Praxis

Bd. 5 der Arbeitsmethoden der medizinischen und
naturwissenschaftlichen Kriminalistik

Schmidt-Römhild, Lübeck, 1966; Hrsg. E. Weinig und St. Berg

37. RAEKALLIO, J.:

Die Altersbestimmung mechanisch bedingter Hautwunden
mit enzymhistochemischen Methoden in:

Arbeitsmethoden der medizinischen und naturwissen-
schaftlichen Kriminalistik

Schmidt-Römhild, Lübeck, 1965

38. RAEKALLIO, J.:

Histochemical studies on vital and post-mortem skin-
wounds. Experimental investigations on medicolegally
significant vital reactions in an early phase of
wound healing

Ann. Med. exp. F. 39, Suppl. 6, 1961

39. RAEKALLIO, J.:

Enzyme histochemistry of wound healing, Stuttgart, 1970

40. RAEKALLIO, J.:

Estimation of the age of injuries by histochemical and
biochemical methods; Z. Rechtsmedizin 73, S. 83, 1973

41. RAEKALLIO, J.:
Timing of wounds in forensic medicine
Jap.J.Legal Med.30,S.125,1976
42. RAEKALLIO, J. und P.L. MAKINEN:
Serotonin content as vital reaction I.Exp.investigations
Zacchia 44,S.403,1970
43. RAEKALLIO, J. und P.L. MAKINEN:
Serotonin and histamine contents as vital reaction II.
Autopsy studies, Zacchia, 45,S.403,1970
44. RAEKALLIO, J.:
Praktische Erfahrungen mit histochemischen und
biochemischen Wundaltersbestimmungen
Inst.für Rechtsmedizin der Universität Turku,Finnland
Heft 40,S.33 ff.,1980
45. RAND, C.W. and C.B. COURVILLE:
Histologic studies in the brain of fatal injury
to the head. VII. Alterations in verve cells
Arch.Neurol.Psychiat.55,79,1946
46. RUBINSTEIN, L.J.,KLATZO, J. and MIQUEL:
Histochemical observations on oxidative enzyme activity
of glial cells in a local brain injury
J.Neuropath.exp.Neurol.21,116,1962
47. SCHACHT, L. und M. MINAUF:
Zentrale Hirnschäden nach Einwirkung stumpfer Gewalt
auf den Schädel
Arch.Psychiat.Nervenkr.207,412,1965
48. SELLIER, K. und F. UNTERHARNSCHEIDT:
Mechanik und Pathomorphologie der Hirnschäden nach
stumpfer Gewalteinwirkung auf den Schädel
Hefte z. Unfallheilkunde 76,1963

49. SOUZA QUEIROZ, L. de, LOPES de FARIA:
Evolution of dark neurons in experimental brain stab wounds
Dept.Path., Univ. of Campinas School Med.
Virchow's Arch., Abt. B, 28, 361-370 (1978)
50. SPATZ, H.:
Von der Morphologie der Gehirntusionen
(besonders der Rindenprellungsherde)
Münch. Med. Wschr. 93, 1, 1951
51. SPATZ, H.:
Über die Erkennbarkeit der Rindenkontusion im Endzustand
in anatomischer und klinischer Hinsicht
ZBI Neurol. Psychiat., 1931
52. SPATZ, H.:
Pathologische Anatomie der gedeckten Hirnverletzung
mit besonderer Berücksichtigung der Rindenkontusion
ZBI Neurol. Psychiat., 1930
53. SPECTOR, R.C.:
Selective changes in dehydrogenase enzymes and pyridine
nucleotides in rat brain in anoxic-ischaemic encephalopathy
Brit. J. exp. Path. 44, 312, 1963
54. SPIELMEYER, W.:
Histopathologie des Nervensystems
Springer, Berlin, 1922
55. TAKAMATSU, H.:
Histochemische Untersuchungen der Phosphatase und deren
Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben
Trans. Soc. Path. Jap., 1939
56. THOMAS, E. and A.G.E. HEARSE:
Histochemical demonstration of damage resistant nerve
cells with a TPN-Diaphorase reaction
Acta neuropath. 3, 238, 1964

57. TYRER, J.H.:
The post-mortem stability of certain oxidative
enzymes in brain and spinal cord
Histochemistry 27, 21, 1971
58. ULRICH, J.:
Grundriß der Neuropathologie
Springer-Verl., Berlin-Heidelberg-New York, 1975
59. UNTERHARNSCHEIDT, F.J.:
Die traumatischen Hirnschäden: mechanogenese,
Pathomorphologie und Klinik
Z. Rechtsmed. 71, 153, 1972
60. WALCHER, K.:
Über vitale Reaktionen
Dtsch.Z.ges.ger.Med., 1930
61. WINCKLER, J.:
Verwendung gefriergetrockneter Kryostatschnitte
für histologische und histochemische Untersuchungen
62. ZOLLINGER, H.-U.:
Pathologische Anatomie
Bd. I, Allgemeine Pathologie
Thieme-Verl. Stuttgart, 1969

Für die freundliche Überlassung des Themas danke ich
Herrn Prof.Dr.Eisenmenger.

Für die Betreuung dieser Arbeit danke ich Herrn Dr.Gilg.

Für die optische Gestaltung gilt mein Dank Herrn
August Bayer.

Lebenslauf

Am 29.1.1954 wurde ich, Paul Anton Oblinger, Sohn des Apothekers Ludwig Oblinger und seiner Gemahlin Maria Theresia Oblinger, geb. Fuchs, als viertes von fünf Kindern in Dillingen/Donau geboren.

Dort besuchte ich von 1960 - 1964 die Volksschule, anschließend von 1964 - 1973 das Gymnasium, an dem ich 1973 die Reifeprüfung ablegte.

Ab Wintersemester 1973/74 studierte ich an der TU-München-Weihenstephan Agrarwissenschaften, wo ich nach dem Wintersemester 1975/76 die Diplomvorprüfung erfolgreich ablegte.

Ab Sommersemester 1976 begann ich an der LMU-München das Studium der Humanmedizin, welches ich im November 1983 mit der Approbation abschloß.

Nach einer intermittierenden Landpraxisvertretung bin ich seit Februar 1984 in der Kurklinik in der Stanggaß in Berchtesgaden unter der Leitung von Prof. Dr. Meier als Stationsarzt tätig.

